



CENTRO DE INVESTIGACIONES
EN ÓPTICA, A.C.

EXCITACIÓN DE NANO ANTENAS CON LUZ VISIBLE Y
OBSERVACIÓN DE SU RESPUESTA EN EL RANGO DE THZ
CON UN MICROSCOPIO CONFOCAL



Como requisito para obtener el grado de: Maestro en
Ciencias (Óptica)

Asesor: Dr. Fernando Mendoza Santoyo

Estudiante: Lic. en Fis. Daniel de Jesús Luis Noriega

Diciembre de 2019
León, Guanajuato, México

Agradecimientos

Al Dr. FJ González y su equipo de trabajo de la UASLP, por haber facilitado las na que se usaron en el trabajo de investigación de esta Tesis.

Al Dr. Mauricio Flores, ya que, sin sus valiosas ayudas este trabajo no hubiera posible.

A mis amigos, que se volvieron mi familia lejos de casa.

A mi asesor, el Dr. Fernando Mendoza Santoyo, por su valiosa guía, un ejemplo a seguir.

A mis padres y hermanos, gracias.

Índice

1	Introducción	7
2	Marco teórico.....	10
2.1	Microscopía.....	10
2.1.1	Breve historia del microscopio y su significado en el campo de la biología y de la medicina.	10
2.1.2	El microscopio óptico, principios, limitaciones y componentes.	13
2.1.2.1	Fidelidad (resolución) de una imagen.....	13
2.1.2.2	Componentes principales de un microscopio.....	14
2.1.2.3	Objetivo del microscopio.	16
2.1.2.5	Epi-iluminación en microscopio fluorescente.....	17
2.1.3	Teoría de Abbe para la formación de imágenes.	18
2.1.3.1	Teoría de la difracción de Abbe en la formación de una imagen y la resolución óptica en el microscopio de luz.....	19
2.1.4	Resolución óptica y poder de resolución	21
2.2	El espécimen a estudiar: Nanoantenas	22
3	Metodología Experimental.....	24
3.1	Preparación de muestras, dispersión de nanopartículas en fluido de inmersión.....	26
3.2	Determinación de concentración de Np para la observación.....	28
3.3	Ensanchar el <i>Spot</i>	29
3.4	Determinación de la potencia del láser <i>Chameleon</i> sobre las nanoantenas	31
3.5	Determinación de la potencia del láser <i>Chameleon</i> sobre las nanopartículas	32
3.6	Metodología para la excitación de Na y observación de la respuesta de las Np	33
4	Análisis de Resultados	39
4.1	Determinación de la concentración de Np para la observación	39
4.2	Potencia del láser <i>Chameleon</i> sobre las Na	39
4.3	Potencia del láser <i>Chameleon</i> sobre las np.....	46
4.4	Excitación de Na y respuesta de las Np.....	49
5	Conclusiones.....	53
6	Bibliografía	54
	Publicaciones de la presente tesis	56

Índice de Figuras

Figura 1. - Esquema que muestra un microscopio óptico típico y el camino que sigue la iluminación [20].	15
Figura 2. - Diagrama esquemático de la definición de NA, en donde se muestra cómo se mide Θ [20].	17
Figura 3. - Esquema de ángulos en la condición del seno del Abbe.	19
Figura 4. - Disco de Airy [23].	20
Figura 5. - Nanoantena bowtie clásica.	22
Figura 6. - Gráfica de respuesta de nanoantena bowtie clásica. Campo eléctrico normalizado emitido (en unidades arbitrarias) por la na contra longitud de onda (μm) con la que es irradiada [9].	23
Figura 7. - Nanopartículas sin dispersar y suspendidas en fluido de inmersión, objetivo 10x.	24
Figura 8. - Botella de fluido de inmersión utilizado.	25
Figura 9. - Nanoantena, con una longitud de $3.5 \mu\text{m}$ de alto por $7 \mu\text{m}$ de largo.	25
Figura 10. - Microscopio confocal Carl Zeiss LSM 710 NLO.	26
Figura 11. - Báscula utilizada para pesar las nanopartículas.	27
Figura 12. - Np dispersas en fluido de inmersión.	27
Figura 13. - Nanoantenas con nanopartículas dispersas en fluido de inmersión, observadas con un objetivo 100x en un microscopio común.	28
Figura 14. - Dimensiones de una na. La longitud diagonal de la antena es de $7.8 \mu\text{m}$.	30
Figura 15. - Diagrama de cómo se busca un spot del láser más ancho: cuando se desplace el sustrato una distancia Δz sobre el eje óptico. a) Sustrato en el foco del objetivo. b) Sustrato desplazado fuera del foco para ensanchar el spot.	30
Figura 16. - Diagrama de la relación entre el desplazamiento Δz , el ángulo de apertura θ y y (mitad de la longitud transversa de una na).	31
Figura 17. - Na dañada.	32
Figura 18. - Sustrato montado en portaobjetos.	33
Figura 19. - Muestra colocada en la platina del microscopio confocal.	34
Figura 20. - Imagen de na con np en aceite de inmersión. Las np están dispersas a lo largo de la gota de fluido de inmersión.	34
Figura 21. - Imán de neodimio usado en el sustrato.	35
Figura 22. - Esquema del portaobjetos en la platina del confocal con imán.	35
Figura 23. - Imagen de np siendo atraídas a la superficie del sustrato por el imán. Nótese la formación de cúmulos de diferentes tamaños y concentraciones.	36
Figura 24. - Imagen del sustrato con np justo después de retirar el imán. Nótese la variedad de aglomeraciones de np en el sustrato, de diferentes densidades y tamaños.	36
Figura 25. - a) Objetivo de inmersión siendo usado a una distancia tal que el sustrato está en el foco. b) Ejemplo de una distancia que es demasiado grande, el fluido de inmersión ya está experimentando una deformación importante.	37
Figura 26. - Imagen del conjunto de nano antenas seleccionado: cómo se puede ver hay muchas zonas en donde las na están dañadas, tanto por irradiar con energías muy altas como por la acción de la limpieza. El círculo amarillo encierra la zona en donde se realizaron las pruebas.	40
Figura 27. - La nanoantena (C20xF20) seleccionada es la del centro de la imagen, que se encuentra en la intersección de las líneas rojas, las cuales son parte del sistema Spot-select del software del microscopio confocal.	40
Figura 28. - a) Na antes de ser irradiada. b) Na después de ser irradiada. Se observa evidencia de daño tanto en sustrato como en la antena.	41
Figura 29. - La nanoantena (C19xF20) seleccionada es la de en medio de la imagen, de nuevo se utilizó el sistema Spot-select.	41

Figura 30.- a) C19x20 antes de ser irradiada. b) C19x20 después de ser irradiada. Se observa daño en la na, aunque se aprecia que es más severo del lado derecho que del izquierdo.	42
Figura 31 .- Esquema del cambio en el cono de luz cuando se desplaza la muestra para ensanchar el spot. a) Posición del cono de luz del láser enfocado en el sustrato, en la zona inferior del campo de visión. b) Posición del cono de luz después de desplazar el sustrato un Δz . En la imagen se observa como el haz de luz continúa su camino, pero al estar lejos del eje óptico su ensanchamiento no es uniforme, pues describe algo parecido a un óvalo.	42
Figura 32.- La nano antena C19x18 se encuentra en la intersección de las líneas del sistema Spot-select en el centro de la imagen. Como en el caso anterior, esta na se escogió por mostrar deterioro avanzado, volviéndola inviable para posteriores pruebas de excitación (solo se usó para probar su desgaste a la irradiación del láser).	43
Figura 33.- Acercamiento a la na antes de ser irradiada con 1000 nm a diferentes potencias.	43
Figura 34.- Imágenes de la na después de ser irradiada con diferentes potencias. a) 2% (17.5 mW), la flecha roja apunta a la zona donde se produjo daño; b) 3% (26.25 mW); c) 4% (35 mW); d) 5% (43.75 mW). La flecha azul apunta a una región en donde se comienza a ver daño muy sutil en el brazo derecho de la antena, después de irradiar con 1000 nm a 5%.	44
Figura 35.- Acercamiento a la na: a) Antes de ser irradiada. b) Después de ser irradiada con 1000 nm al 5% (43.75 mW).	45
Figura 36.- Comparación na antes y después de ser irradiada. a) Antes de ser irradiada; b) Después de ser irradiada con 4.5% (39.4 mW). No hay daños aparentes en la na.	45
Figura 37.- Nanoantena antes (a) y después (b) de ser irradiada con 4.8% (42 mW). No hay desgaste aparente.	45
Figura 38.- Se escogió una zona continua a un conjunto de na, que sirvieron de referencia en el caso de que los cúmulos de np se desplacen en el campo de visión, pues aparte de las na y algunas marcas oportunas del fabricante, el sustrato es liso, por lo que se puede llegar a perder el cúmulo de np bajo observación, si este se mueve fuera del campo de visión.	46
Figura 39.- Cúmulos al inicio (a) y al final (b) del proceso de irradiación. Hay dos cúmulos, el señalado por la flecha azul es más denso que el señalado por la flecha roja. Al final de la prueba se observa que el cúmulo más denso apenas se movió.	47
Figura 40.- a) Primera imagen tomada a un tiempo $t = 2s$; b) Imagen a un tiempo $t = 20s$; c) Imagen a un tiempo $t = 40s$. Se aprecia como con el pasar del tiempo los cúmulos más grandes se ven afectados más en comparación de los chicos. El cúmulo dentro del círculo azul se vio alterado mucho más que el que se encuentra dentro del círculo rojo. Por otro lado, las np menos densas en el “velo” dentro del círculo verde apenas se vieron afectadas.	47
Figura 41.- a) Imagen capturada al inicio; b) Imagen capturada al final en el tiempo $t = 6 \text{ min } 30s$. En las imágenes se resaltan dos zonas de interés, un cúmulo denso dentro del círculo azul y un grupo de np menos compacto en el círculo rojo. En ninguno de los dos se observan grandes cambios.	48
Figura 42.- a) Imagen tomada al inicio $t = 2s$; b) Cúmulos a un tiempo $t = 1 \text{ min } 39s$; c) Cúmulos a un tiempo $t = 3 \text{ min } 16s$; d) Cúmulo a un tiempo $t = 4 \text{ min } 54s$; e) Cúmulos a un tiempo $t = 6 \text{ min } 31s$.	49
Figura 43.- a) Sustrato sin aplicar fluido de inmersión con np, observado por un objetivo 50x; b) Sustrato observado a través del 63x, con las np dispersas, antes de colocar el imán; c) Sustrato a un minuto de colocar el imán.	50
Figura 44.- a) Conjunto de na tal como se aprecia en el software ZEN del microscopio confocal durante el Spot-select después del $t_r = 5 \text{ min } 30s$ de relajación. Esas formas parecidas a cometas que se ven en la imagen son los cúmulos densos de np que se formaron por el imán, que se deformaron cuando el imán fue retirado del microscopio; b) Sustrato después de ser irradiado.	50
Figura 45.- Ambas imágenes son acercamientos sobre la misma zona; a) Antes de irradiar; b) Después de irradiar. Los círculos azules encierran las na de interés que lograron “atrapar” una línea de np.	51

Figura 46.- a) n_a con n_p antes de ser irradiadas; b) n_a y n_p después de ser irradiadas. Se puede apreciar un reacomodo de n_p , el cual parece seguir la simetría de las n_a , pero este podría no ser el reacomodo resultante de la irradiación, pues por un número de factores como el desplazamiento del fluido de inmersión Δz , el cual fue demasiado grande, no se puede estar seguros de que es el verdadero reacomodo resultante de la excitación de las n_a . _____ 52

Figura 47.- a) Imagen de la n_a justo después de irradiar, con las n_p claramente superpuestas; b) 40 segundos después, las n_p se han desplazado y ya no están por encima de la n_a , dicho de otro modo, hubo un desplazamiento de las n_p cuando se dejó de irradiar con λ_e . _____ 52

1 Introducción

Han sido más de cien años que hacemos uso de antenas y se han vuelto un elemento imprescindible en la tecnología de transmisión de información sin cables. Las antenas son instrumentos capaces de transformar corrientes eléctricas en ondas electromagnéticas (em) de radio, y de manera inversa, ondas de radio en corrientes eléctricas [1]. El progreso natural de la tecnología, llevó de manera natural a la reducción en el tamaño de estos instrumentos, y esto a su vez dio nacimiento a un conjunto de dispositivos como las nanoantenas (na) ópticas que pueden enfocar más allá del límite de difracción, lo cual permite la búsqueda y exaltamiento para mejorar procesos ópticos como generación de armónicos [2], fluorescencia [3,4], esparcimiento Raman [5,6] y absorción en el infrarrojo [7,8]. Recientemente se han estudiado las características de la emisión em de las nanoantenas ópticas, tipo *bowtie*, a través de simulaciones e interferometría [9].

Las partículas ferromagnéticas cuando son tan pequeñas como (o cerca de) el dominio magnético, empiezan a mostrar una propiedad llamada super-paramagnetismo, en la que dichas partículas son altamente susceptibles a campos magnéticos. Además, son altamente resistentes a la precipitación una vez mono dispersas en un fluido y si llegan a ser magnetizadas por un campo magnético, dejan de estarlo tan pronto como el campo es retirado; conjuntamente, tienen una resistencia nativa a aglomerarse por sí mismas [10]. Es sabido que las nanopartículas metálicas mantienen modos plasmónicos de resonancia en las longitudes de onda visibles, convirtiéndolas en antenas ópticas naturales [2,11].

Desde hace mucho tiempo se propuso la idea de usar nanopartículas de oro como concentradores de radiación en modelos de superficie para superar las limitaciones de la difracción en la captura de imágenes [12], pero el concepto de usar nanopartículas de oro como nanoantenas no surgió hasta después [13]. Las nanopartículas se han estudiado desde el punto de vista de nanoantenas, es decir emisores y receptores [14]. Pero el rubro más concurrido en cuanto a nanoantenas, son las investigaciones centradas en estudiar sus características de emisión y absorción de energía. Dichas investigaciones suelen centrarse en el análisis a través de simulaciones [15,16], experimentos de laboratorio [7,17] y a veces ambos [9,18,19]. Sin embargo, no hay antecedentes de investigaciones en donde se busque categorizar el em emitido por una nanoantena a través del uso de nanopartículas, existen trabajos previos en los que se les da trato de nanoantenas a las nanopartículas, pero no donde se busque usar nanopartículas para investigar el campo de una nanoantena ya existente.

En los métodos de simulación anteriormente mencionados se carece de la obvia evidencia física de la que son acreedoras las investigaciones de laboratorio. Y las investigaciones experimentales a su vez, aunque producen evidencia física del fenómeno en cuestión, tienden a ser técnicamente demandantes tanto en la calidad de los equipos como en capacitación del operador.

El presente trabajo propone un método nuevo para estudiar el campo em emitido por nanoantenas excitadas por medios ópticos, a través de la respuesta dinámica de nanopartículas ferromagnéticas a dicho campo. Así, el propósito de este trabajo de Tesis es caracterizar cualitativamente el comportamiento dinámico de nanopartículas super-paramagnéticas al exponerlas al campo magnético producido por nanoantenas tipo *bowtie*, las cuales son excitadas por medios ópticos. Para cumplir este objetivo, usaremos un microscopio confocal. La microscopía confocal es una técnica usada principalmente en especímenes biológicos que permite el aumento en la resolución y contraste a través del uso de un *pinhole*, el cual elimina el paso de la luz que se encuentra fuera del plano focal seleccionando de este modo la profundidad de foco dentro del espécimen bajo observación. Para la adquisición de imágenes, el microscopio confocal usa un láser que escanea pequeñas porciones del objeto bajo observación mientras un sensor recoge la información resultante: el láser se mueve a las siguientes secciones adyacentes de la muestra en el mismo plano focal, mientras el sensor recoge la información de la nueva zona iluminada, todo esto se logra generalmente mediante espejos montados en transductores piezoeléctricos. El proceso se repite hasta que la zona completa de interés es analizada. Después, por procesamiento digital de imágenes la información de cada sección es unida y la imagen digital del espécimen es reconstruida [20].

Adicionalmente, la investigación presentada en la Tesis reporta sobre el comportamiento dinámico de nanopartículas sometidas al campo magnético producido por nanoantenas, para lo cual es necesario tener un arreglo experimental que nos permita no solamente irradiar dichas nanoantenas, sino también es necesario que nos permita observar las nanoantenas antes y después del fenómeno. Pero dado que, para facilitar la dispersión y localización de nanopartículas sobre el sustrato, estas estarán suspendidas entre el observador y las nanoantenas, obstruyendo la visión y limitando la calidad de las imágenes que se puedan adquirir. Además, el mejor modo de irradiar la antena es de manera perpendicular a su superficie. Todo lo anterior supone complicaciones importantes en el caso de que se usara un microscopio común, las nanopartículas suspendidas no permitirían la observación de las nanoantenas (al menos no a concentraciones que sean adecuadas para apreciar el recomodo de nanopartículas por el campo em), para hacer incidir de manera normal el láser de excitación este tendría que ser introducido en el microscopio de manera que el haz emerja por el objetivo y hacia las nanoantenas, lo cual si bien es técnicamente posible, no es práctico. Esto sin mencionar la limitada resolución y contraste, pues cabe mencionar que el sustrato, al ser bastante opaco, es necesario iluminarlo con una fuente desde el mismo lado que esta el objetivo, lo cual se complica enormemente cuando se trabaja con objetivos con distancias de trabajo cortas, esto sin mencionar que el sustrato además de opaco tiene alta reflectividad, lo que hace que se sature la imagen de las nanoantenas. Sin embargo, todo esto es posible resolverlo con la implementación de un microscopio confocal, pues no sólo obtendremos mejor resolución y contraste. Asimismo, por sus cualidades de selección de profundidad, será posible observar las nanoantenas aun con las nanopartículas suspendidas entre objetivo y sustrato. Además, permitirá una gran capacidad de discriminación de área en el momento de excitar la iluminación perpendicular de las nanoantenas. A su vez, el microscopio confocal por diseño puede usar iluminación del mismo lado que la observación, y al ser un sistema de captura por escaneo laser, el sensor formador de imagen no se saturara. Por todo esto el microscopio confocal es el mejor sistema para observar el fenómeno.

Se logró estudiar por medio de pruebas visibles el campo em emitido por nanoantenas clásicas *bowtie*, las cuales se excitaron por medios ópticos en el rango de los THz. El campo em de las nanoantenas fue observado a través del reacomodo de nanopartículas metálicas superparamagneticas.

La Tesis está dividida en los siguientes capítulos: Marco teórico, en el cual se explicarán los principios detrás del funcionamiento de un microscopio confocal, las nanopartículas (np) y las nanoantenas (na); Metodología Experimental, en donde se describen en orden cronológico los procesos necesarios para llevar a cabo el experimento para excitar las na; Análisis de Resultados. que examina los datos obtenidos y busca dar explicación a los resultados observados; Conclusiones en donde se expone la importancia de los resultados obtenidos, así como se propone el trabajo a seguir.

2 Marco teórico

2.1 Microscopía

La microscopía comenzó por la necesidad de observar especímenes vivos y más recientemente ha comenzado una revolución para regresar a la observación de especímenes *in vivo* (dentro de especímenes vivos).

2.1.1 Breve historia del microscopio y su significado en el campo de la biología y de la medicina.

El microscopio óptico (que utiliza luz visible para la observación de los objetos), es un instrumento que en muchos casos es usado como un juguete de interés, se convirtió en un instrumento de ciencia básica e investigación clínica; da al observador una vista del espacio interior, un mundo que no puede ser observado simplemente con el ojo dada la insuficiencia de resolución, tales como átomos, moléculas, virus, células, tejidos y microorganismos [19].

Una de las preguntas que podrían surgir es por qué los avances en la manufactura de telescopios no se transfirieron de manera rápida al microscopio. Una respuesta parcialmente sesgada es que los telescopios eran del dominio de matemáticos y físicos, mientras que el diseño, manufactura y uso de los microscopios ópticos era dejado a las personas laicas, los cuales ahora llamamos entusiastas.

La historia del microscopio está íntimamente conectada a los avances en óptica. Dichos avances se dieron a lo largo de cientos de años, con contribuciones de académicos de muchos lugares. Un ejemplo destacable es el trabajo de Ibn al-Haytham, con su trabajo "*Tesoros ópticos*", en donde describió las leyes de propagación rectilínea de la luz, y de su refracción y reflexión. El trabajo de Ibn al-Haytham sería conocido en Europa en los siglos XVI y XVII como *Opticae Thesauris* por Willerbrord Snellius, René Descartes, Johannes Kepler y Christian Huygens.

Durante muchos años las leyes de reflexión y refracción fueron usadas para diseñar instrumentos ópticos, pero después de la publicación *Traité de la Lumière* de Huygens en 1690, se comenzó a trazar frentes de onda geométricos. Para el siglo 17, los avances de la óptica en temas como la ley de refracción, óptica geométrica, trazo de rayos y la teoría de la propagación geométrica de ondas de luz de Huygens ya habían contribuido de gran manera al desarrollo de la microscopía. En el siglo XIX la teoría de la difracción fue aprovechada por Abbe para explicar la resolución óptica de los microscopios: su trabajo fue aplicado a las propiedades ondulatorias de la luz, especialmente la difracción de la luz, y a la formación de imágenes y resolución óptica, sin duda temas trascendentales en el desarrollo del microscopio óptico. En el siglo XX, las teorías sobre interferencia y polarización de la luz fueron desarrolladas en el microscopio de interferencia

y el microscopio de contraste de fase. Estas técnicas resultaron en microscopios ópticos que dan contraste en células y tejidos vivos sin teñir. Una contribución interesante se destaca en el desarrollo del microscopio de electrones que aportó avances en el entendimiento de la naturaleza dual de la materia, en particular de los electrones y su concepto ondulatorio; se hace notar de igual manera el diseño y construcción de lentes magnéticas para enfocar el haz de electrones.

A continuación, se presenta una breve línea del tiempo con algunos de los progresos más notables de la microscopía óptica.

En 1675 Antonio Leeuwenhoek construyó un microscopio de una sola lente doble convexa con una magnificación máxima de 270x, el sol como fuente de iluminación y el ojo como detector. Logró observar y reportar bacterias, espermatozoides, células rojas, plantas simples, la estructura de la córnea, el lente ocular, el nervio óptico y el músculo estriado. Se considera que de esta manera comenzó la observación de las células vivas con el microscopio.

En 1830, Joseph Jackson Lister a través del uso de una lente con una aberración esférica pequeña a la cual le agregó un conjunto de lentes para obtener una magnificación alta de todo el conjunto, demostró como la combinación de varias lentes podían minimizar el problema de la aberración esférica. Las lentes adicionales no aportaban a la aberración esférica de la primera lente, pero si aumentaban la magnificación total. Este importante avance permitió construir objetivos con aperturas más grandes, lo cual resultó en un incremento en la resolución del microscopio.

Otro problema presente era la aberración cromática. En 1813, Giovanni Battista Amici logró resolver el problema al inventar un microscopio horizontal acromático basado en espejos. Después, en 1816, Fraunhofer inventó una lente sencilla acromática que consistía en dos diferentes tipos de vidrio en contacto. No fue sino hasta 1830 con el crecimiento en el desarrollo y disponibilidad de microscopios acromáticos, que la calidad óptica de los microscopios sobrepasó la calidad de las imágenes obtenidas con el microscopio sencillo de una lente.

Después de la invención de Lister y la subsecuente creación de objetivos acromáticos, el siguiente problema importante a solucionar era el de incrementar la resolución del microscopio óptico. Fue en 1870 que Ernst Abbe elaboró la teoría de la difracción para la formación de imágenes que derivó en la fórmula que relaciona la resolución con la longitud de onda de la luz de iluminación y el número de apertura (NA, por sus siglas en inglés: *Numerical Apperture*) del objetivo. Abbe demostró que, para aumentar la resolución de un microscopio, es necesario recolectar de la muestra un cono de luz tan amplio como sea posible. Para lograr este propósito en 1890 Abbe introdujo varios objetivos de inmersión de aceite con una NA de 1.4. Estos microscopios recién desarrollados lograron su resolución teórica de 0.2 μm con luz visible.

Después de que se obtuvo la solución técnica al problema de la resolución, el siguiente paso fueron las soluciones al problema de contraste, por ejemplo, cómo producir contraste en especímenes delgados y transparentes, tales como células vivas sin teñir (marcar), las cuales tienen inherentemente poco contraste. Las células vivas delgadas y transparentes observadas a través de microscopios ópticos son objetos de fase, y son difíciles de observar bajo la luz normal que se usa en un microscopio. El principal efecto de la luz que pasa a través de la célula es el cambio de fase acorde al camino que recorre a través de varias regiones de la célula. Esto es un problema, pues el ojo humano detecta diferencias en intensidad de luz, pero no de fase. Fue en 1932 cuando Zernike inventó un microscopio de contraste de fase el cual convierte las pequeñas diferencias de fase de la luz que interacciona con el espécimen, en diferencias de intensidad de iluminación que el ojo humano puede detectar. Recientemente, el desarrollo del microscopio de escaneo de electrones junto con las técnicas de grabado y fractura por congelación, han resultado en la observación de la estructura fina interna de células y membranas.

Una vez que los problemas de aberración y resolución óptica fueron suficientemente resueltos como para permitir la manufactura de microscopios con suficiente resolución para resolver bacterias, el siguiente paso fue el desarrollo de técnicas y métodos que aportaran una mejora en el contraste y especificidad (adecuación para la tarea que se le va a destinar al microscopio en cuestión). Uno de los grandes avances en microscopía óptica, usando microscopía confocal y excitación multifotónica, es la invención de microscopía fluorescente. La microscopía confocal es una técnica en la cual se incrementa la resolución óptica y el contraste a través del uso de un *pinhole* (agujero pequeño generalmente de forma circular) el cual bloquea la luz que se encuentre fuera de foco durante la formación de la imagen [21]. Y, la excitación multifotónica es una técnica en la cual se produce fluorescencia en una muestra (por lo general orgánica) la cual es excitada con dos (o más) fotones los cuales tendrán una longitud de onda menor a la de la luz emitida por la fluorescencia [22]. En 1852, George G. Stokes observó en una solución de quinina lo que a continuación él llamaría “fluorescencia”. Stokes notó que la fluorescencia es típicamente observada en longitudes de onda más largas que la de la luz de excitación (desplazamiento de Stokes). Es gracias al desplazamiento de Stokes que es posible separar con un conjunto de filtros la luz de fluorescencia de la luz de excitación. Otra propiedad de la fluorescencia que es extremadamente útil en microscopía es que la absorción y emisión de luz de la molécula fluorescente está relacionada con su estructura. Las limitaciones de la microscopía fluorescente de campo amplio se vuelven evidentes para el caso en el cual los especímenes son objetos gruesos altamente dispersivos. Para estos especímenes, la imagen es borrosa y el contraste está degradado porque la fluorescencia y dispersión de debajo y encima del plano focal aportan a la imagen. La microscopía fluorescente permite lograr una especificidad y contraste alto. Por ejemplo, usando esta técnica es posible etiquetar proteínas individuales, organelos en células individuales, estructuras de cito esqueletos, membranas de células, partes de cromosomas, neuronas individuales, etc. Una gran desventaja es que un microscopio de fluorescencia de campo amplio no tiene resolución de profundidad.

2.1.2 El microscopio óptico, principios, limitaciones y componentes.

Un microscopio provee para el observador una imagen magnificada del objeto bajo inspección, aunque su función más importante es aumentar la resolución, esto es la capacidad de distinguir detalles finos en la imagen del objeto. Con un microscopio podemos observar objetos que de otro modo no serían visibles y resolver detalles que no son visibles para el ojo humano. Un punto por resaltar aquí es que a menos que haya suficiente contraste en la imagen no se observarán detalles del objeto. Así que la microscopía óptica depende de ambos, resolución y contraste.

2.1.2.1 Fidelidad (resolución) de una imagen.

Como en todos los sistemas que capturan imágenes, el microscopio óptico mapea un objeto en una imagen de éste. Un sistema ideal lograría hacer el mapeo con la máxima fidelidad entre imagen y objeto. Pero tanto la apertura finita de la lente como las aberraciones propias de la óptica que forma la imagen limitan de manera fundamental la fidelidad que podemos lograr en el mapeo. ¿Qué se necesita para obtener suficiente resolución temporal y espacial en un microscopio óptico? La resolución espacial denota la habilidad del microscopio para resolver o separar dos puntos adyacentes en el objeto bajo observación. La temporal se refiere a que el microscopio debe de ser capaz de resolver las frecuencias espaciales más altas que sean necesarias para formar una imagen fidedigna del objeto, una que sea apropiada para la cuestión a estudiar propuesta por el observador. Así, para lograr mapear el objeto en la imagen con una alta fidelidad, es necesario mapear tanto las intensidades como las frecuencias espaciales del objeto. La frecuencia espacial es la frecuencia en el espacio para un patrón recurrente dado en unidades de líneas/mm (líneas por milímetro). El teorema de Nyquist, válido tanto para las frecuencias espaciales como las temporales, define cómo se muestrea el objeto, viz., este último debe realizarse al menos dos veces la frecuencia espacial más alta en el objeto, lo anterior una condición necesaria para reproducir de manera precisa la imagen del objeto. Si el sistema de captura de imagen no cumple con el criterio de Nyquist, la imagen tendrá *aliasing*: es el fenómeno que ocurre cuando una estructura periódica de un objeto sea mapeada de manera incorrecta en la imagen. Dicho de otra manera, el *aliasing* causa que frecuencias más altas que el criterio de Nyquist se muestren a frecuencias inferiores.

Además de la resolución espacial, resolución transversal (en el plano del espécimen) y resolución axial (a lo largo del eje óptico del microscopio), también tenemos la resolución temporal. En el dado caso de que el espécimen esté fijo, no esté vivo y sea estacionario, en otras palabras, un fenómeno estacionario independiente del tiempo, entonces el tiempo no es un objeto por considerar. Pero si estamos usando un microscopio óptico para observar un fenómeno dependiente en el tiempo, entonces la resolución temporal es importante. En general, requerimos adquirir imágenes separadas (secuencia de imágenes en el tiempo) que no distorsionen los eventos temporales observados. Para hacer esto de manera correcta, el microscopio debe adquirir imágenes a una razón de al menos el doble del evento más rápido. De ese modo podemos asegurar que los eventos temporales no están distorsionados.

Por otro lado, cabe hacer notar que hay un compromiso que se debe tener entre el campo de visión y la resolución, i.e., si requerimos un campo de visión grande en la imagen entonces dicha imagen tendrá una resolución inferior, comparado con un microscopio potente y un objetivo con un NA alto.

¿Entonces, qué puede contribuir a la pérdida de la fidelidad en una imagen? Primero, la resolución del microscopio óptico es demasiado baja para resolver los detalles finos del objeto. Segundo, si la dinámica del fenómeno que está siendo capturado es demasiado rápida en comparación a la velocidad de adquisición de las imágenes, entonces la dinámica de los eventos temporales estará distorsionada. Tercero, las aberraciones ópticas del microscopio pueden degradar la resolución de la imagen. Cuarto, para lograr el máximo desempeño de un microscopio que se encuentra limitado por difracción es necesario usar el NA del objetivo del microscopio en toda su extensión. La resolución se verá comprometida si la fuente de iluminación no cubre el plano focal del objetivo en toda su extensión. Quinto, la resolución es uno de los requerimientos para la formación de la imagen, y de igual manera también se requieren niveles apropiados de contraste.

También hay elementos que pueden degradar la imagen y no son propios del diseño del microscopio, como el que las superficies de los elementos del microscopio, específicamente el objetivo, podrían no estar libres de suciedad, polvo, aceite, fibras y/o rayaduras mecánicas. El polvo y las rayaduras mecánicas degradan la calidad de la imagen, reducen la resolución y contribuyen al incremento de luz espuria con la subsiguiente disminución en el contraste de la imagen.

2.1.2.2 Componentes principales de un microscopio.

Los componentes de un microscopio incluyen (pero no están limitados a): fuente de luz, sistema de iluminación, condensador, algunos diafragmas, la plataforma de observación, fluido de inmersión, cubreobjetos, objetivos de microscopio, tubo, lentes del tubo, ocular, varios filtros, polarizadores y otros elementos ópticos. El detector puede ser el ojo, una película fotosensible o un sistema electrónico de captura (Figura 1).

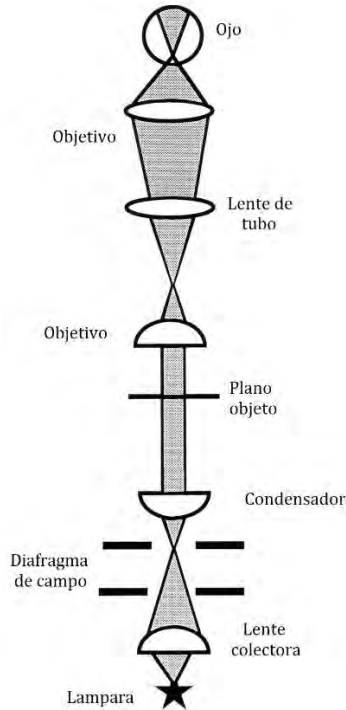


Figura 1.- Esquema que muestra un microscopio óptico típico y el camino que sigue la iluminación [20].

La fuente de luz ilumina al objeto cuya imagen es detectada por el sensor. Los componentes del sistema de iluminación se encuentran por lo general debajo del espécimen. Además de la lente condensadora también se encuentran un diafragma de campo y un iris de apertura, siendo el propósito de estos componentes el de proveer una iluminación uniforme. Por encima del espécimen se encuentran dos lentes magnificadoras importantes, a saber: el objetivo del microscopio que es el componente indispensable para obtener una alta resolución y que funciona como colector de luz proveniente desde varios puntos del objeto, y que redirecciona la luz al punto correspondiente de la imagen; el ocular que forma una imagen real en el sensor. La apertura es el área de la lente que está disponible para coleccionar y permitir el pase de la luz proveniente del objeto. La pupila se define como la aparente sección transversal mínima común en la que todos los rayos de luz tanto del lado del objeto (pupila de entrada) como de la imagen (pupila de salida) se confinan. Un diafragma provee una limitación mecánica para una abertura normal al eje óptico que limita el área de la sección transversal del camino de la luz en un punto dado en el sistema óptico.

Dos términos comúnmente usados en lentes son los planos focales frontal y anterior. El plano focal anterior de una lente es el plano focal que queda detrás de la lente cuando se observa en la dirección del paso de la luz. El plano focal frontal queda en el frente de la lente cuando se observa en la dirección del paso de la luz. El plano focal del objetivo del microscopio se desplaza a través del espécimen por dos medios. Primero, la plataforma mecánica que contiene el espécimen se puede mover ya sea manual o mecánicamente (por medio de un motor de pasos precisos) a lo largo del eje óptico del microscopio. Segundo, para movimientos pequeños y muy precisos a lo

largo del eje óptico un dispositivo piezoeléctrico de micro posicionamiento mueve el objetivo del microscopio con respecto a la plataforma estacionaria del microscopio. En cualquier caso, la distancia entre el espécimen y el lente frontal del objetivo del microscopio se ve alterada.

También es necesario definir los términos de profundidad de campo y profundidad de foco. Profundidad de campo (profundidad de nitidez en el espacio del objeto) es la profundidad axial a ambos lados del objeto en la cual se puede mover el objeto sin pérdida detectable de nitidez en la imagen. La profundidad de foco (profundidad de nitidez en el espacio imagen) se define como la profundidad axial en el espacio en ambos lados del plano imagen dentro del cual la imagen parece estar aceptablemente nítida mientras las posiciones del plano objeto y el objetivo se mantienen.

Hay que hacer notar que las variaciones en la temperatura y las vibraciones mecánicas propias del funcionamiento del microscopio como motores, controladores, obturadores, ventiladores enfriadores de láseres y lámpara se ven aumentadas en gran medida y afectan el correcto funcionamiento. De manera similar, las vibraciones de sonidos, elevadores, motores y tráfico de las calles se pueden transmitir al microscopio. Por eso es común colocar los microscopios en mesas antivibración.

2.1.2.3 Objetivo del microscopio.

El objetivo de microscopio es un elemento crítico que por lo general llega a formar un conjunto designado como parafocal, esto es, son objetivos que están montados de tal manera que, con el espécimen en una posición fija, cada uno de los objetivos está al mismo nivel de foco en el espécimen. Esto facilita el cambio de objetivos, los cuales comúnmente se encuentran montados en un revólver giratorio. Los objetivos de microscopio se encuentran optimizados para aplicaciones específicas y clasificados en grupos de acuerdo con el nivel de corrección de aberraciones que tienen. Por ejemplo, los objetivos acromáticos son aquellos que se encuentran corregidos para la aberración esférica a 540 nm. Los objetivos apocromáticos, originalmente diseñados por Abbe, están altamente corregidos para cuatro longitudes de onda para aberraciones esféricas y cromáticas. Son muy útiles en la microscopía de color con luz blanca, vienen con NA grande y son transparentes en el ultravioleta, siendo entonces útiles en la microscopía fluorescente de luz baja y para microscopía fluorescente usando tintes que tienen una banda de absorción en la región ultravioleta.

El NA de un objetivo de microscopio se define como $NA = n \sin \Theta$, donde n es el índice refracción del medio medido a 687 nm, y Θ es la mitad de la apertura angular, en otras palabras, la mitad del ángulo del rayo de luz incidente en la parte superior o el lente frontal del objetivo del microscopio, (Figura 2), en otras palabras es el ángulo de apertura definido como un medio del ángulo plano que está limitado por una lente en el centro de un objeto o imagen por dos rayos marginales opuestos cuando la lente se usa en su correcta posición de trabajo.

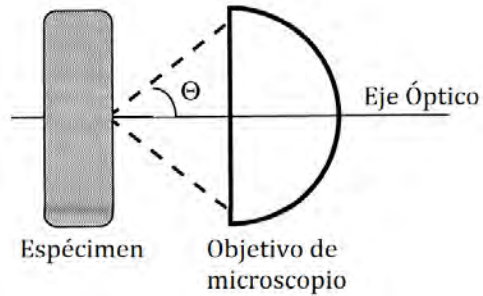


Figura 2.- Diagrama esquemático de la definición de NA, en donde se muestra cómo se mide Θ [20].

El índice de refracción se define como el cociente de la velocidad de la luz en el vacío sobre la velocidad de la luz en un medio diferente (al cual entra la luz, diferente al vacío). Para un objetivo de microscopio seco (o expuesto solo al aire que lo rodea), el medio es el aire con un índice de refracción de aproximadamente 1.000293; para objetivos de microscopio de inmersión en aceite, el medio es aceite con un índice de refracción de aproximadamente 1.515; y para objetivos de inmersión en agua, el medio es agua con un índice de refracción de 1.333.

Por lo general, las lentes tienen dos aperturas numéricas: una en el lado de la imagen y otra en el lado de objeto. Cuando hablemos de NA nos referiremos a la del lado del objeto. La apertura numérica es función de tres propiedades: Primera, entre más alto sea el valor de NA , más grande el poder resolutivo, o la capacidad de resolver dos puntos del objeto; segunda, entre más grande el valor de NA , más luminosa la imagen en el microscopio; y tercera, entre más grande el valor de NA , más pequeña la profundidad de foco. Cabe hacer notar que la profundidad de foco es diferente a la distancia de trabajo libre, la cual pone una limitación crítica a la profundidad que el objetivo puede enfocar a través del espécimen antes de que éste haga contacto con la lente exterior al objetivo. Por ejemplo, si requerimos que el objetivo sea capaz de enfocar a través de la córnea la cual tiene 500 μm de ancho en su región central, entonces la distancia libre de trabajo del objetivo seleccionado para este espécimen debe ser mayor a 500 μm .

La resolución final y calidad de las imágenes de un microscopio óptico son funciones de varios componentes: la fuente y el sistema de iluminación, el objetivo de microscopio, y otros componentes ópticos tales como divisores de haz, filtros y polarizadores.

2.1.2.5 Epi-iluminación en microscopio fluorescente.

En un microscopio óptico de transmisión (Figura 1), la luz de iluminación está de un lado del espécimen, y la luz del espécimen usada en la formación de la imagen está del lado opuesto. Cuando la muestra es opaca, la microscopía de transmisión de luz no es posible y se utilizan otro tipo de configuraciones.

Se emplean varios términos para referirse a microscopios ópticos en los cuales la luz de iluminación y la luz del espécimen están limitadas al mismo lado del espécimen; luz reflejada, luz incidente, o epi-iluminación. Un microscopio de luz incidente es uno en el cual el objetivo del microscopio funciona como su propio condensador. Esto implica que para evitar reducir el NA del objetivo, lo cual resultaría en una reducción de la resolución y del brillo en la imagen, el iris de apertura no se encuentra localizado en la pupila del objetivo. En su lugar, el iris de apertura se encuentra alternativamente localizado entre la fuente de luz y el iris de campo, y una lente forma la imagen del iris de apertura en la pupila del objetivo.

En el modo de iluminación epi-fluorescente, el objetivo actúa como ambos: el condensador y el colector de la luz fluorescente y reflejada. Con este modo, el microscopio usa un filtro epi-fluorescente que dirige la luz de excitación hacia el objetivo de microscopio y excluye la luz de excitación de pasar hacia el ocular o el medio de captura. La luz de excitación es separada de la luz fluorescente por medio de un espejo dicróico que está diseñado y construido para reflejar selectivamente la longitud de onda más corta de la luz de excitación y transmitir la longitud de onda más larga de la luz de fluorescencia. Dicho de otro modo, un espejo dicróico funciona reflejando la luz no deseada de regreso a la fuente de iluminación.

2.1.3 Teoría de Abbe para la formación de imágenes.

La teoría de difracción de Abbe y el conjunto de sus experimentos con rejillas, aperturas y lentes usados en la observación del patrón de difracción en el plano focal anterior del objetivo del microscopio dieron la evidencia suficiente de que existe un límite a qué tan alta es la capacidad de una lente para resolver los detalles espaciales más finos al formar una imagen del objeto. Fue en 1866 cuando a petición de Carl Zeiss, Abbe se planteó la meta de cimentar una base científica para la construcción de microscopios. Abbe a través de muchos experimentos y llegar a un entendimiento profundo de los principios de la formación de imágenes en microscopios ópticos, llegó a dos descubrimientos teóricos: primero, la influencia de la apertura angular en la resolución de un microscopio es resultado de la difracción de luz causada por el espécimen; y segundo, la llamada condición del seno de Abbe.

La teoría paraxial (o fórmula paraxial), aplica a los rayos de luz que están suficientemente cerca del eje óptico de tal manera que $\sin \Theta \approx \Theta$, donde Θ es el ángulo que un rayo enfocado o divergente hace con el eje óptico. La teoría paraxial no es suficiente para calcular el límite de resolución de un microscopio o calcular las aberraciones en un objetivo de microscopio. La teoría física de la formación de una imagen óptica y la derivación del límite de la resolución de una lente depende del uso de la óptica física, la cual incorpora las propiedades ondulatorias de la luz y explica fenómenos como la difracción de luz. Los objetivos modernos, con su resolución limitada por la difracción, son diseñados en conformidad con la condición de seno de Abbe. La condición del seno de Abbe es una expresión del trazo exacto de rayos para calcular la posición de todos los rayos que entran a la lente.

Para el caso de un plano objeto e imagen orientados perpendicularmente al eje óptico de una lente con una magnificación transversal o lateral, M , hacemos U el ángulo relativo al eje óptico de un rayo desde un punto objeto axial (Figura 3). U puede ser también definido como el ángulo del rayo marginal con el eje óptico del lado del objeto; U' es el ángulo entre el rayo marginal y el eje óptico del lado de la imagen. La condición de seno de Abbe mapea el ángulo U del rayo entrando el objetivo al ángulo U' del rayo conforme llega al plano imagen. La condición de seno de Abbe está dada como $n \sin U = M n' \sin U'$, donde n y n' son los índices de refracción del medio a cada lado (espacio objeto e imagen, respectivamente) de la lente.

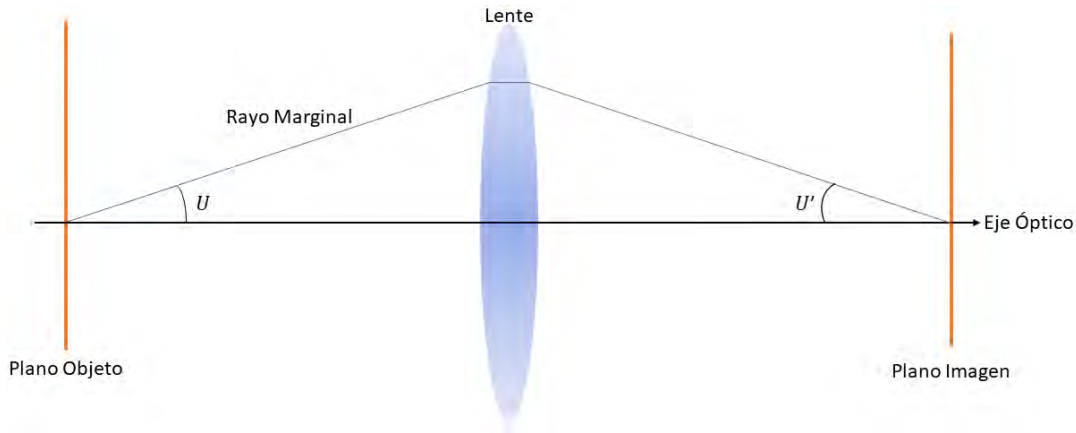


Figura 3.- Esquema de ángulos en la condición del seno del Abbe.

Abbe demostró que el poder de resolución de un microscopio está en función de la longitud de onda la luz usada para formar la imagen y la apertura angular o cono del objetivo del microscopio (2Θ). Θ es la mitad de la apertura angular del objetivo, n es el índice de refracción del medio en el espacio entre el objetivo y el espécimen. Así, Abbe definió la apertura numérica como $NA = n \sin \Theta$. Como ya se mencionó anteriormente, el valor de NA es una característica crítica en el objetivo de microscopio, indicando entre otros el ángulo de aceptación de luz. Este ángulo determina el poder de resolución del objetivo y su profundidad de campo.

2.1.3.1 Teoría de la difracción de Abbe en la formación de una imagen y la resolución óptica en el microscopio de luz.

Definiciones:

- Difracción es la desviación en la dirección de propagación de la luz cuando su frente de onda pasa por la orilla de un obstáculo. Un patrón de difracción se forma en el plano focal anterior del objetivo del microscopio y consiste en una distribución de intensidad que varía angularmente con la dirección, y resulta de la interferencia entre porciones de la radiación difractada las cuales tienen diferentes relaciones de fase. El límite de difracción del poder de resolución o resolución limitada por la difracción, es una limitación

fundamental impuesta en el poder de resolución de un sistema óptico solamente por la difracción, y no por las aberraciones.

- Longitud de camino óptico en un medio homogéneo, es la longitud “geométrica” que recorre el haz de luz en ese medio.
- Interferencia es la sobre-posición o traslape entre dos o más frentes de onda. La interferencia puede ser constructiva o destructiva, y convierte las diferencias de camino óptico del haz de luz que pasa por un objeto en variaciones de intensidad en la imagen, y por lo tanto provee contraste.

En la presencia de un sistema óptico libre de aberraciones y limitado por difracción, el corte en dos dimensiones del patrón de difracción en el plano focal es llamado el disco de Airy (Figura 4), que incluye los anillos de difracción. El tamaño del anillo de Airy está relacionado con la longitud de onda de la luz de iluminación y con la NA del objetivo del microscopio a través de la siguiente relación:

$$r = \frac{1.22\lambda}{NA}$$

En donde r es el radio de la mancha para un punto auto luminiscente en el plano imagen; λ es la longitud de onda de la luz de iluminación; y NA es la apertura numérica del objetivo del microscopio. La fórmula indica que el radio del anillo de Airy va a incrementar junto con la longitud de onda, y va a reducirse conforme NA aumente.



Figura 4.- Disco de Airy [23].

La teoría de difracción de Abbe tiene tres partes: Primero, el espécimen difracta la luz de iluminación. Segundo, la luz difractada entra en el microscopio por el objetivo, y tercero, la interferencia de la luz difractada y la no difractada en el plano imagen. La lente debe tener una apertura de dimensiones suficientes para poder transmitir el patrón de difracción completo producido por el objeto: si la apertura solo transmite una porción del patrón de difracción, la imagen resultante asemejará una imagen virtual que resultará en un patrón de difracción que la apertura transmitió. Por ejemplo, para las frecuencias altas del objeto y una apertura pequeña

resultan en que parte del patrón de difracción de los detalles finos del objeto no son transmitidos por la apertura de la lente, entonces esos detalles serán invisibles sin importar la magnificación usada. Cuando la apertura de una lente es mucho más grande, los órdenes de difracción más altos de la luz difractada del objeto se combinan, y así la imagen del objeto contiene muchos más detalles de las frecuencias espaciales más altas y por esto es una representación más fiel del objeto. En resumen, el punto más importante de la teoría de Abbe es que para luz de una longitud de onda dada (que es el caso presente en la mayoría de los experimentos), el poder de resolución del objetivo del microscopio está determinado por el valor de NA .

2.1.4 Resolución óptica y poder de resolución

El poder de resolución se refiere al detalle más pequeño que un microscopio puede resolver al realizar la imagen de un espécimen. Se dice entonces que está en función del diseño del instrumento y las propiedades de la luz usada durante la formación de imágenes. Y la resolución indica el nivel de detalle que en realidad se observa en el espécimen: depende del poder resolutivo y el contraste generado por el microscopio, así como el contraste generado en el espécimen y el ruido en el sensor. La teoría de Abbe plantea tres puntos importantes y sus consecuencias: primero, el poder de resolución de un objetivo de microscopio es medido por su habilidad para diferenciar dos puntos en la imagen del objeto. Entre más pequeña sea la distancia entre los puntos que puede distinguir, más grande es su poder de resolución. Segundo, entre más pequeña sea la longitud de onda usada para iluminar, estos dos puntos serán observables a distancias más cortas. Tercero, conforme incrementamos NA , dos puntos aún más cercanos serán observables. Con luz visible (400 a 700 nm), la distancia mínima de resolución entre dos puntos es de 0.25 μm .

Son de considerarse en este punto de la Tesis los criterios de Sparrow y Rayleigh, usados para definir la resolución de un sistema óptico capaz de resolver dos puntos a una distancia mínima de separación. La definición de Sparrow es que dos puntos de igual brillo son observados como dos puntos si la intensidad en el punto medio entre ellos es igual a la intensidad en los puntos. Antes de hablar de la definición de Rayleigh es necesario definir el disco de Airy (Figura 4), el cual consiste en un pico de intensidad rodeado por anillo de intensidades más débiles separados por anillos oscuros. Aproximadamente 80% de la intensidad incidente está en el punto central, cuyo tamaño es proporcional a la longitud de onda incidente e inversamente proporcional al NA . Al considerar que un microscopio forma la imagen de un espécimen, el microscopio se asume libre de aberraciones y la imagen es formada solamente por la difracción de la luz en el espécimen, esto es, cada punto del objeto representado en la imagen no es un punto conjugado como tal, pero un patrón de difracción de Airy. Por lo tanto, el poder resolutivo del microscopio se puede determinar con la medición experimental del tamaño del disco de Airy del patrón de difracción, el cual es controlado por la longitud de onda de la luz, el índice de refracción del medio entre el espécimen y el objetivo del microscopio, la apertura numérica del objetivo y los lentes condensadores del microscopio. Entonces, el criterio de Rayleigh con luz incoherente es que dos puntos de igual brillo se pueden observar cómo dos puntos separados si el punto medio entre ellos es 26.5% más débil que la intensidad de cada punto.

2.2 El espécimen a estudiar: Nanoantenas

Las nanoantenas (na) son un concepto novedoso motivo de mucha investigación multidisciplinaria e interdisciplinaria, pero de manera particular, y para el objetivo de esta Tesis, es su probada emisión de ondas em en la región de los THz, zona del em que está en el estado del arte científico y tecnológico en óptica y fotónica. De manera similar a las antenas de radio, su propósito es asimilar energía libre que se propaga y convertirla en energía localizada, y viceversa. Estas nanoantenas ópticas aprovechan las propiedades únicas de las nanoestructuras metálicas que se comportan como plasmas fuertemente acoplados a frecuencias ópticas [18].

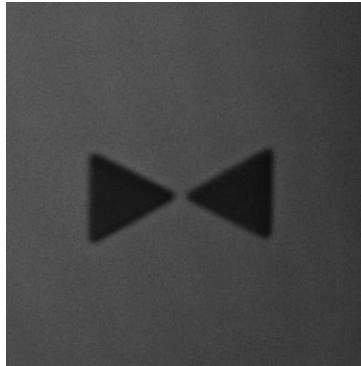


Figura 5.- Nanoantena *bowtie* clásica.

Las na ópticas tienen longitudes de onda a las que son más propensas de resonar, y por lo tanto a emitir ondas em. En simulaciones por computadora, se ha observado que las na *bowtie* clásicas (Figura 5) son más propensas a resonar a longitudes de onda de $9\ \mu\text{m}$. En la Figura 6 se observan los resultados de la simulación del campo eléctrico en la región central de la na, en donde los dos triángulos están más cercanos, que es clásicamente la región con el campo eléctrico más intenso en este tipo de na. También cabe mencionar que las na son susceptibles a la polarización de la luz con las que se les irradia. Las na *bowtie* clásicas muestran tener una mejor respuesta (en simulaciones) cuando se les irradia con una polarización a 45° , seguido del caso con polarización horizontal (con respecto a la Figura 5) y dan la menor respuesta cuando se les irradia con una polarización vertical [9].

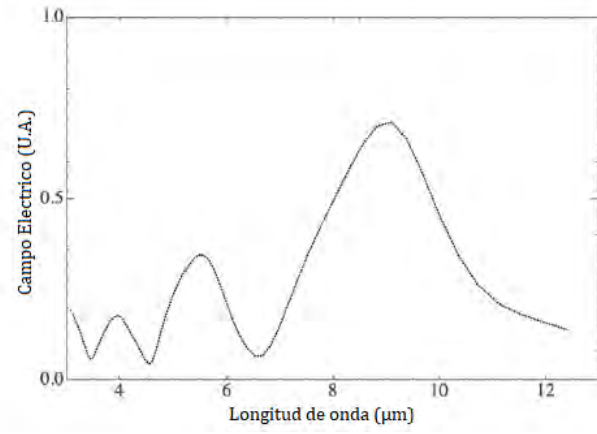


Figura 6.- Gráfica de respuesta de nanoantena *bowtie* clásica. Campo eléctrico normalizado emitido (en unidades arbitrarias) por la na contra longitud de onda (μm) con la que es irradiada [9].

3 Metodología Experimental

Se optó por usar nanopartículas (np) esféricas de Fe_3O_4 con un tamaño que va de los 50 nm a 100 nm (*Sigma Aldrich Chemistry*). Esto, dado que con ese tamaño y forma exhibirán propiedades superparamagnéticas, ósea, alta susceptibilidad a campos magnéticos, resistencia a aglomerarse y a precipitarse [24][25]. Las np, Figura 7, se encontraban sin recubrir debido a que el recubrimiento tendía a desprenderse en el proceso de preparación de la muestra y contaminaba el medio dispersivo. Cabe hacer notar que, dado que las np son demasiado pequeñas, no será posible discernirlas como objetos individuales sino más bien como cúmulos lo suficientemente grandes o densos para ser observados.

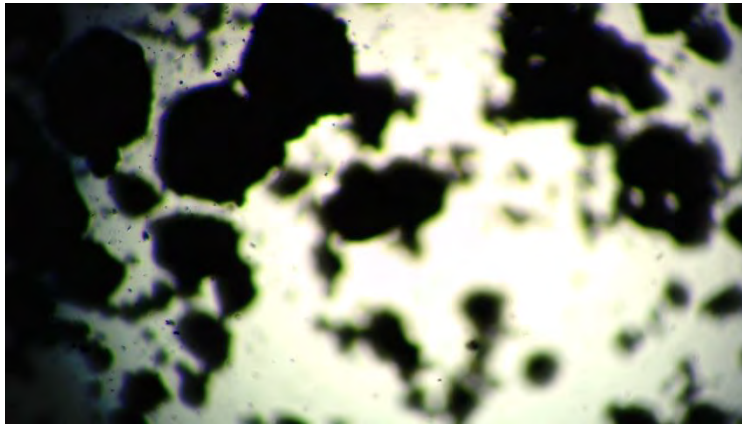


Figura 7. -Nanopartículas sin dispersar y suspendidas en fluido de inmersión, objetivo 10x.

Como medio dispersivo usamos fluido para objetivos de inmersión tipo N con un índice de refracción de 1.518, libre de halógenos y basado en aceite de éster e hidrocarburos sintéticos de *Leica Microsystems* (Figura 8). Este fluido es no polar, lo que implica que no ionizará las np y por ende no tenderán a aglomerarse por la interacción con el fluido.



Figura 8. - Botella de fluido de inmersión utilizado.

Se usaron nanoantenas (na) del tipo *Bowtie*, hechas con oro (Au) depositado por la técnica de *sputtergin* sobre un sustrato de silicio (Si), ver Figura 9. Estas na fueron diseñadas y fabricadas en el Grupo del Dr. Francisco Javier González de la UASLP, a quien aquí agradecemos por facilitarlas para estos experimentos.

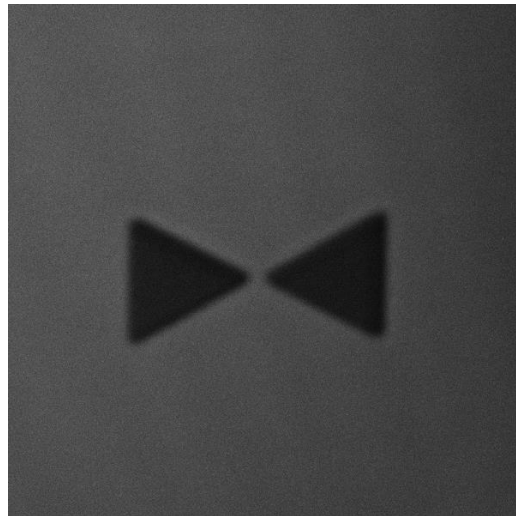


Figura 9.- Nanoantena, con una longitud de $3.5 \mu\text{m}$ de alto por $7 \mu\text{m}$ de largo.

Para observar el comportamiento de las np se empleó un microscopio confocal LSM 710 NLO *Carl Zeiss* (Figura 10), usando un objetivo plano-apocromático con una magnificación de 63x y un número de apertura (NA) de 1.46.



Figura 10.- Microscopio confocal Carl Zeiss LSM 710 NLO.

Como fuente para iluminación para la observación se usó un láser He-Ne a 543 nm (en el color verde del espectro) con una potencia de 1 mW (cuando está al 100%), y como medio de excitación se usó un láser *Coherent* modelo *Chameleon Ultra* sintonizable ajustado en 1000 nm a una potencia de 0.875 W (cuando trabaja al 100%), polarizado horizontalmente. La potencia real usada de ambos láseres es controlable por medio de atenuadores que son manipulados desde el *software* del microscopio. Hay que hacer notar que esta es la longitud de onda más alta (1000 nm) disponible en este microscopio.

Como contenedor de la muestra se optó por usar tubos eppendorf de polipropileno de 2.0 mL, tanto por la conveniencia del tamaño como por la facilidad de usar con micropipetas.

3.1 Preparación de muestras, dispersión de nanopartículas en fluido de inmersión

El procedimiento de preparación consiste en primero pesar la cantidad de np a utilizar, para ello se utilizó una balanza (Figura 11) *Sartorius* modelo CPA2250, con una resolución de 0.01 mg. Después, con ayuda de una micropipeta se procede a depositar un volumen conocido de fluido de inmersión (de 20 μ l a 400 μ l, dependiendo del de si la muestra es para pruebas de concentración o si será usada en las na excitadas); es de vital importancia que no se forme una bolsa de aire al fondo del eppendorf, pues si llega a suceder las np se verán atrapadas ahí y podrían no dispersarse en el siguiente paso del procedimiento.



Figura 11.- Báscula utilizada para pesar las nanopartículas.

Enseguida se deposita el eppendorf cerrado en un baño ultrasónico, ya sea sosteniéndolo o colocándolo en un cuadro de hule espuma, esto para que el contenido se conserve en el fondo del eppendorf y no se esparza el aceite de inmersión en el interior (Figura 12), lo que podría interferir con la correcta dispersión de las np. Por prueba y error, se determinó que el tiempo en el baño ultrasónico debe de ser mayor a 2 min (para lograr la correcta dispersión) pero no mayor a 8 minutos. Esto último, dado a que el baño sonificador funciona produciendo ondas de sonido a frecuencias no audibles (40 kHz), lo que produce una delta de presión dentro del fluido y produce cavitación, que a su vez resulta en burbujas en los momentos de presión baja que explotan en los momentos de presión alta: son estas burbujas lo que hace que dentro del eppendorf se dispersen las np. Pero a su vez, al ser un fenómeno en donde se aplica energía de manera continua en el tiempo, la muestra tiende a calentarse y si no se tiene cuidado el fluido de inmersión subirá demasiado su temperatura y cambiará su índice de refracción (a 27°C, según el fabricante), lo que podría reducir de manera considerable la calidad de las imágenes observadas cuando se use con el objetivo de microscopio, pues este último está diseñado para trabajar solo con un índice de refracción en específico.



Figura 12.- Np dispersas en fluido de inmersión.

Cabe hacer notar que por prueba y error se llegó a la conclusión que la vida útil de una muestra era de no más de un día, pues muestras con más tiempo empezaban a mostrar aglomeraciones cuando eran observadas bajo un microscopio (aun en uno común). Además, no siempre se les podía volver a re-dispersar en el baño sónico. Por todo esto, cada muestra es preparada el día mismo que se va a usar.

3.2 Determinación de concentración de N_p para la observación

Es importante determinar la concentración de n_p en el fluido de inmersión, ya que la cantidad correcta hará que sea posible observar las nanoantenas en el sustrato: si la concentración es demasiada alta será imposible ver las n_a dado que las n_p son altamente opacas; además entre mayor sea la concentración más rápido se dará el aglomeramiento y precipitación de las n_p hacia la parte inferior. Por otro lado, si la cantidad de n_p es insuficiente, la aglomeración de n_p sobre y alrededor de la antena no será observable, por lo que es necesario buscar ambos, el límite superior e inferior de la concentración de n_p : dicho de otro modo, que la concentración sea alta como para que el fenómeno sea observable pero no tanto como para que el objetivo se sature y no sea posible ver nada.



Figura 13.- Nanoantenas con nanopartículas dispersas en fluido de inmersión, observadas con un objetivo 100x en un microscopio común.

Con la muestra ya dispersa (Figura 13), se usa una micropipeta para depositar un volumen conocido en un microscopio común para someter la concentración a una valoración de visibilidad. Para esto último, se utilizó el sustrato como fondo y se escogió una zona con un conjunto de n_a , así si era posible ver las nanoantenas a través del fluido de inmersión se determinaba que la visibilidad era buena, en caso contrario se asumía que la visibilidad era mala y se repetía la prueba con otra muestra. El procedimiento es como sigue:

La muestra 1 tendrá un volumen ($V_{1,1}$) de fluido de inmersión y una masa ($m_{1,1}$) de n_p , con los cuales se puede determinar la concentración ρ_1 a partir de la formula $\rho_1 = m_{1,1}/V_{1,1}$. Enseguida se

toma un volumen V_{sp} de la muestra 1 el cual será el fluido a observar bajo el microscopio. Entonces la muestra en el recipiente quedará con un volumen $V_{1,2} = V_{1,1} - V_{sp}$ y una masa de np igual a $m_{1,2} = \rho_1 V_{1,2}$.

Para preparar la muestra 2, se añade un volumen V_{imm} de fluido de inmersión al $V_{1,2}$ de tal manera que el volumen, masa y concentración quedarán como $V_{2,1} = V_{1,2} + V_{imm}$, $m_{2,1} = m_{1,2}$ y $\rho_2 = m_{2,1}/V_{2,1}$. Se vuelve a someter la muestra al baño sonificador y se repite la toma de V_{sp} de la muestra 2 para ser observada en el microscopio, lo que nos deja con un $V_{2,2} = V_{2,1} - V_{sp}$ y una masa $m_{2,2} = \rho_2 V_{2,2}$. Se repite el procedimiento hasta alcanzar una concentración con una visibilidad adecuada para la observación, pues con cada iteración del procedimiento de preparación de muestra la concentración de np en cada muestra se ve reducida.

Este procedimiento, en otras palabras, consiste en preparar una muestra en la que se conoce la concentración, volumen y masa de las np; tomar un volumen conocido para la observación, a partir del volumen que se tomó hacer el cálculo del volumen y masa de las np que se conserva en el recipiente eppendorf (esto último con la concentración). Agregar más fluido de inmersión, hacer los cálculos de volumen (fluido de inmersión) y masa (np), dispersar con el baño sonificador, tomar el volumen a observar en el microscopio y repetir todo lo anterior. Todo esto, mientras la concentración de np baja con cada preparación de la muestra. El objetivo es el de dispersar las np en el campo de trabajo donde se encuentran las na, y poder ver ambas con claridad en un microscopio óptico convencional.

Se optó por este método dado que la cantidad de material, tanto de fluido de inmersión como de np, que se utiliza en cada preparación de la muestra es baja, pues solo se agrega más fluido de inmersión y se vuelven a esparcir las nanopartículas ya presentes en el eppendorf. Además de que con este método evitamos el laborioso trabajo de pesar las np cada vez. Este proceso no solo provee una concentración adecuada para observar el sustrato a través del fluido de inmersión con np, sino que da una idea de que cómo varía la visibilidad con la concentración, conceptos que resultarán de utilidad cuando pasemos al microscopio confocal, dado que la concentración determinada por este método es solo adecuada para observar en microscopio convencional. Al pasar al microscopio confocal, su potencia resolutive y la necesidad emergente de aumentar la presencia de np en la vecindad de las na, nos permitirán corregir la concentración.

3.3 Ensanchar el *Spot*

Esta es una parte crítica del proceso. Sabemos que el diámetro del *spot* del láser sobre la muestra está dado por la longitud de onda del láser y el número de apertura del objetivo:

$$d_s = \frac{1.22\lambda}{NA}$$

Entonces, dado que estamos irradiando con una longitud de onda de $\lambda = 1\mu\text{m}$, aun con el objetivo de menor NA (0.25, 10x) el spot más grande que podríamos conseguir es de $4.88\mu\text{m}$. Pero la longitud que se tiene que cubrir es de al menos $7.8\mu\text{m}$ (Figura 14), que corresponde a las dimensiones de una na. Ahora, el problema se agrava cuando consideramos que estamos irradiando $1\mu\text{m}$ en un objetivo con un NA muy grande (1.46) el cual nos da como resultado un *spot* con un diámetro aún más chico ($0.84\mu\text{m}$).

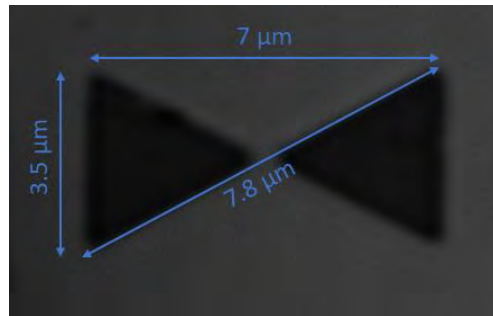


Figura 14.- Dimensiones de una na. La longitud diagonal de la antena es de $7.8\mu\text{m}$.

Para resolver este inconveniente, la opción fue la de buscar un *spot* del láser más ancho, lo cual se obtiene al desplazar la muestra sobre el eje óptico: esta acción moverá el sustrato del foco del objetivo y lo pondrá en una posición en la cual el spot es más ancho (Figura 15).

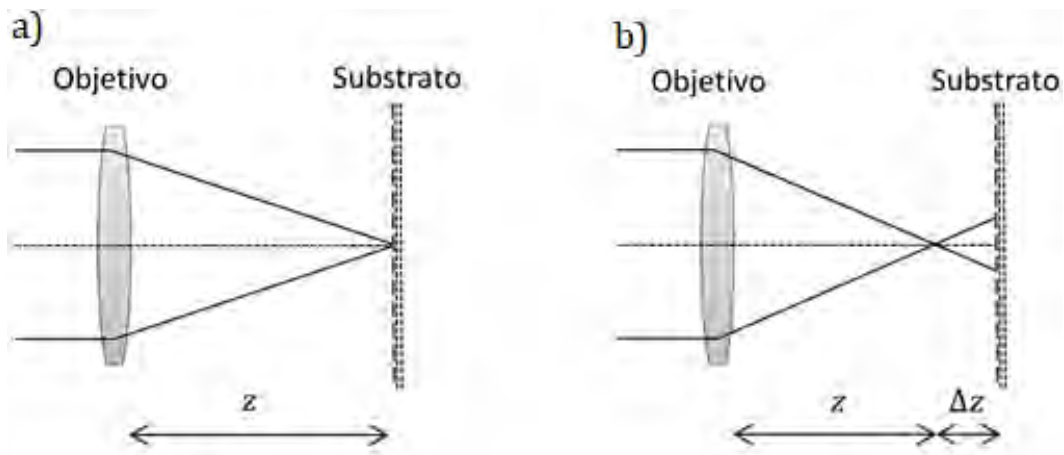


Figura 15.- Diagrama de cómo se busca un *spot* del láser más ancho: cuando se desplace el sustrato una distancia Δz sobre el eje óptico. a) Sustrato en el foco del objetivo. b) Sustrato desplazado fuera del foco para ensanchar el *spot*.

De lo anterior, el número de apertura NA , relacionado con la mitad del valor del ángulo del cono de luz y el valor del índice de refracción del medio:

$$NA = n \sin \theta$$

y de los datos del objetivo, se puede obtener el ángulo de apertura θ . Entonces, ya con el conocimiento del ángulo de apertura y el triángulo rectángulo (Figura 16, que muestra el cateto adyacente el valor Δz , desplazamiento en el eje óptico; el cateto opuesto y que es la mitad del valor de la sección transversal de la na a cubrir; y θ , el ángulo de apertura), se obtiene que el desplazamiento en el eje óptico viene dado por:

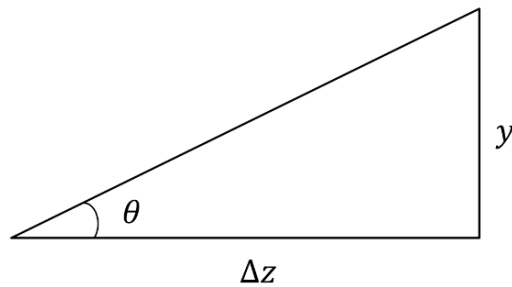


Figura 16.- Diagrama de la relación entre el desplazamiento Δz , el ángulo de apertura θ y y (mitad de la longitud transversal de una na).

$$\Delta z = \frac{y}{\tan \theta}$$

Este resultado permite controlar el tamaño del *spot* y así adaptarlo a las necesidades específicas del experimento, ya sean iluminar una sola antena o un conjunto a la vez, lo único que hace falta es conocer los datos del objetivo y las dimensiones del objeto que quiere iluminar.

3.4 Determinación de la potencia del láser *Chameleon* sobre las nanoantenas

Es necesario conocer la respuesta de las na a la potencia del láser, pues si está es demasiada alta, las nanoantenas comenzarán a experimentar un desgaste hasta que ya no sean útiles o bien desaparezcan por completo del sustrato (Figura 17).

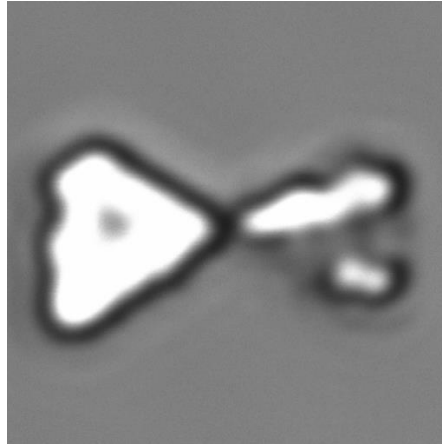


Figura 17.- Na dañada.

Para evitar esto, es necesario conocer la respuesta de las na al láser. Se optó por observar el comportamiento en los casos que serían más importantes para la investigación. Dichos casos serán: nanoantenas irradiadas en lapsos cortos de tiempo con potencias altas y lapsos de tiempo largos a potencias bajas. El primer caso será útil cuando se busque una respuesta veloz por parte de las np al campo em producido por las na, o sea, un campo em fuerte, pero de poca duración. Y el segundo, será de utilidad cuando se busque someter a las np a un campo em débil, pero en periodos extensos de tiempo. Sin embargo, en ambos casos se buscará la potencia más alta que las na son capaces de soportar antes de demostrar daño físico.

Para cada uno de los dos tipos de prueba se usará la metodología (anteriormente descrita) para ensanchar el *spot* del láser. Y dado que la cantidad, tanto de sustratos como de conjuntos de nanoantenas en ellos, es limitada, las pruebas se harán sobre na individuales, buscando que el *spot* solo cubra la superficie de la na que se va a irradiar. Y aunque estas pruebas no serán del todo demostrativas cuando busquemos irradiar cúmulos completos, sí se podrá asociar la intensidad del láser que la na es capaz de soportar con zonas más grandes (conjuntos de nanoantenas completos) a través del tamaño del *spot* y la potencia por unidad de área (W/m^2).

3.5 Determinación de la potencia del láser *Chameleon* sobre las nanopartículas

A igual que con las nanoantenas, las nanopartículas se ven afectadas por la potencia del láser, y si bien no se deforman como las na, si parecen manifestar un comportamiento dinámico, en el cual tienden a aglomerarse y formar cúmulos. Y esto supone un impedimento muy grande para el experimento, pues el comportamiento de las np que resulta de la afectación del campo magnético producido por las na podría verse afectado por la intensidad del láser, o en su defecto no se podría discernir si el comportamiento observado por parte de las np es por el campo magnético de las na o por el láser con el que se estamos irradiando, o ambos. Con el propósito de acercarse a los objetivos del experimento que es la sola excitación de na (o lo más posible), las pruebas de potencia se llevarán a cabo sobre el sustrato, pero en zonas sin presencia de na. Habiendo hecho

estas consideraciones, el comportamiento de las np se pondrá a prueba bajo dos longitudes de onda. La primera será a $\lambda_o = 543\text{nm}$, la cual es la longitud de onda para la observación y captura, y por lo tanto se debe estar seguros de que no afectará a las np. La segunda lambda será $\lambda_e = 1000\text{nm}$, la longitud de onda de excitación del láser *Chameleon*.

3.6 Metodología para la excitación de Na y observación de la respuesta de las Np

Lo primero es montar el sustrato en un portaobjetos, como se muestra en la Figura 18. Esto para que no importe cuánto tiempo lleve la muestra montada en el microscopio o almacenada, no se mueva en el portaobjetos, lo cual evita que durante las capturas no haya un desplazamiento de la muestra, lo que produciría un cambio en la resolución e iluminación de esta, por no mencionar el tamaño del *spot*. Además de que esta montura permite sostener la muestra de tal manera que no se mueva, también es no invasiva durante la captura o excitación, pues interfiere poco o nada con la superficie observable del sustrato. Adicionalmente, no importa si el aceite de inmersión se mete debajo del sustrato, la cinta no se despegará, pues la cinta que sostiene el sustrato está a su vez debajo de otra capa de cinta, lo que evita que el aceite debilite el adhesivo de la cinta que sostiene al sustrato por las orillas.



Figura 18.- Sustrato montado en portaobjetos.

Ya con la muestra de np dispersas en fluido de inmersión y el sustrato correctamente montado, se procede a colocar el sustrato en la plataforma de observación del microscopio confocal (Figura 19), buscando una zona de trabajo con un conjunto de na que sean viables para el experimento (que no estén severamente desgastadas o incompletas); finalmente se coloca una gota de fluido con np (Figura 20).



Figura 19.- Muestra colocada en la platina del microscopio confocal.

Lo primero que se observa con el objetivo de inmersión plano apocromático de 63x, es que no parece haber muchas np en la vecindad de las na, y esto pasa aun cuando se usan concentraciones altas de np. Recordemos que entre más altas sean las concentraciones de np solo se logra que se reduzca la visibilidad, además de que no necesariamente aumenta significativamente la cantidad de np en las inmediaciones de na. La presencia de suficientes np en la vecindad de las na es crucial para observar el fenómeno de interacción del campo em con las np de óxido de hierro, pues hay que hacer notar que el campo em generado por las na es de apenas unos pocos micrómetros alrededor de éstas.

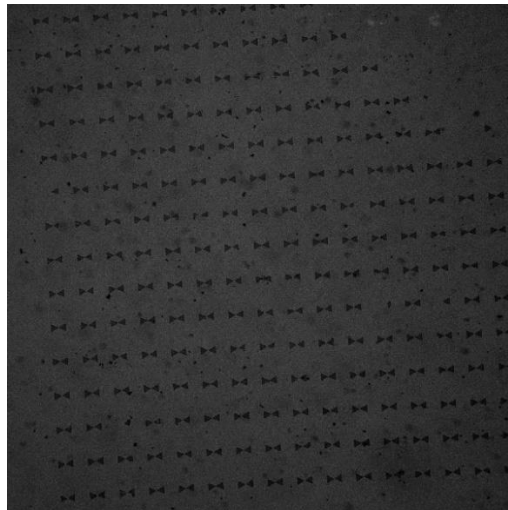


Figura 20.- Imagen de na con np en aceite de inmersión. Las np están dispersas a lo largo de la gota de fluido de inmersión.

Para resolver el problema de la baja densidad de np en la vecindad de las na, se decidió que la mejor manera sería atraer a las np al sustrato con la ayuda de un campo magnético externo. Para ello se usó un imán de neodimio de 1.40-1.46 Teslas de forma rectangular, de 1.89 cm de alto, 1.89 cm de largo y 0.97 cm de grosor (Figura 21).



Figura 21.- Imán de neodimio usado en el sustrato.

Estando el portaobjetos ya colocado en la platina del microscopio confocal, procedemos a colocar el imán encima del portaobjetos, detrás del sustrato (Figura 22). El tiempo que el imán dure detrás del sustrato es controlado, pues si el tiempo es muy corto la concentración no será suficiente, pero si es demasiado largo los cúmulos formados por las n_p serán demasiado grandes (Figura 23). Lo anterior conlleva a un conjunto nuevo de problemas, e.g., los cúmulos formados por las n_p pueden llegar a ser demasiado grandes y entonces no ser afectados por el campo em de las n_a , o que sean tan densos que obstruyan la correcta irradiación de las n_a , pues recordemos que para que éstas produzcan un campo em es necesario que sean iluminadas en su totalidad.

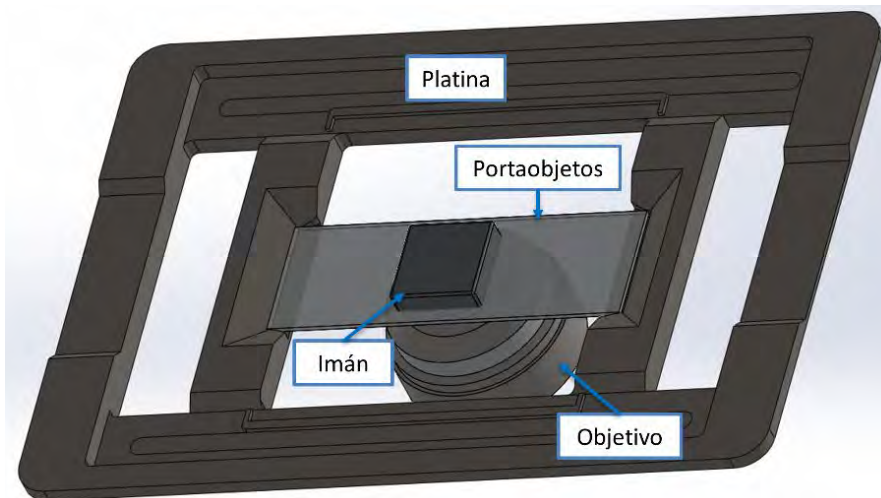


Figura 22.- Esquema del portaobjetos en la platina del confocal con imán.

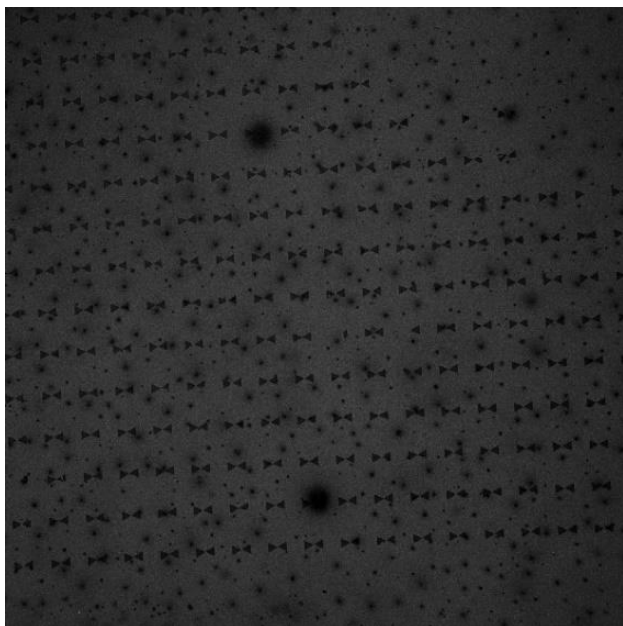


Figura 23.- Imagen de np siendo atraídas a la superficie del sustrato por el imán. Nótese la formación de cúmulos de diferentes tamaños y concentraciones.

Cuando el imán sea retirado se procede a corregir cualquier desajuste en la imagen que resulte de la acción de poner y quitar el imán: se da un tiempo de relajación con el propósito de que cualquier movimiento que pudieran tener las np como resultado de quitar el imán, cese (Figura 24).

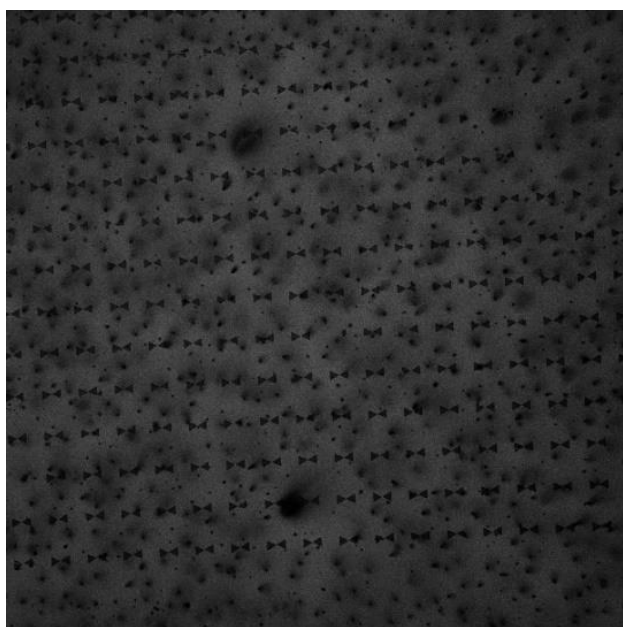


Figura 24.- Imagen del sustrato con np justo después de retirar el imán. Nótese la variedad de aglomeraciones de np en el sustrato, de diferentes densidades y tamaños.

Enseguida se capturan una o varias imágenes de la zona de interés. Cuando ya se capturaron todas las imágenes necesarias se desplaza la platina una distancia Δz , esta distancia estará en función de la superficie que queramos cubrir sobre el sustrato. Es importante mencionar que Δz no debe ser demasiado grande, pues podría provocar que el fluido de inmersión se deforme demasiado, lo que haría que al momento de regresar la platina al foco del objetivo se produzca un desplazamiento de fluido de inmersión y con él de np (Figura 25), lo que podría alterar el patrón de np que se hubiera podido formar.

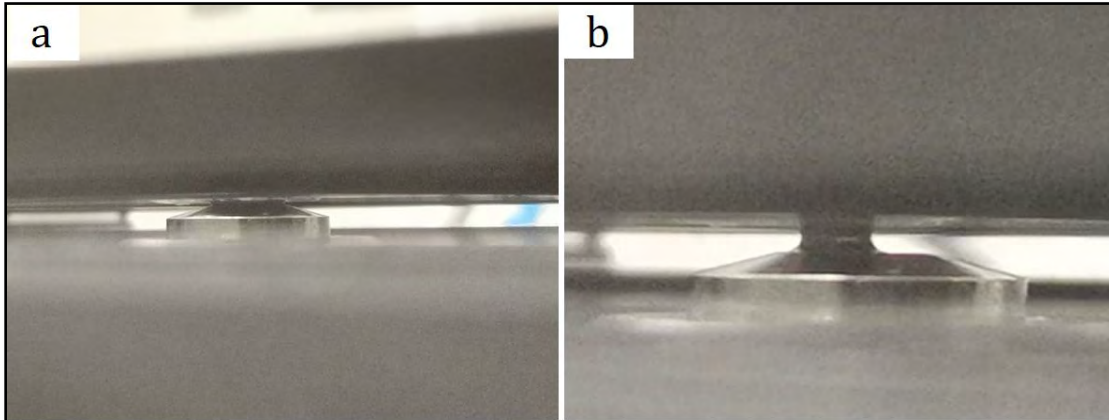


Figura 25.- a) Objetivo de inmersión siendo usado a una distancia tal que el sustrato está en el foco. b) Ejemplo de una distancia que es demasiado grande, el fluido de inmersión ya está experimentando una deformación importante.

Después, se selecciona el modo *Spot* en los modos de captura del microscopio y se ilumina la muestra por un periodo de tiempo determinado. Cabe mencionar que durante el modo de captura *Spot* el microscopio no captura imágenes ni video, pues en este modo lo que hace es que irradia de manera continua sobre un punto por un tiempo específico. Y aunque de algún modo el microscopio lograra capturar algo a través del objetivo durante este periodo de tiempo, no lograría ver nada, dado que el sustrato está fuera de foco, en otras palabras, no es posible capturar el fenómeno mientras transcurre, solo los resultados de la radiación, pues en cuanto se dejan de iluminar las na el campo em cesa. En cuanto el periodo de irradiación termine, es necesario regresar la platina al foco del objetivo, esto porque, como se verá más adelante, las np comienzan a desplazarse tan pronto como se detiene la λ_e , por lo que el tiempo que transcurre entre que se deja de irradiar y la captura de las imágenes resultantes después de excitar es de primordial importancia. Después de regresar la platina al foco, se toman imágenes del sustrato para capturar el reacomodo de las np y comparar con las imágenes tomadas antes de irradiar con λ_e .

Si se desea realizar el experimento enseguida es necesario hacerlo en un área que no fue irradiada anteriormente, o bien deshacer cualquier patrón que se haya podido formar por las anteriores irradiaciones. Esto último se puede lograr de dos maneras, una es colocando el imán de nuevo, algo que no es tan recomendable ya que cada vez que se usa se aumenta la formación y

tamaño de los cúmulos existentes de np, lo que dificulta la observación del fenómeno. La otra manera es retirar el portaobjetos del microscopio y limpiar ambos, objetivo y sustrato, para empezar la toma de imágenes desde cero. Este último tampoco es del todo recomendable, pues cada vez que se retira el fluido de inmersión del sustrato (con acetona, tolueno o hexano) las na en el sustrato se van degradando poco a poco, hasta que ya no son útiles o bien desaparecen por completo. Por estas razones, la opción de preferencia cuando se trata de repetir el experimento enseguida es moverse a una zona en donde no se haya irradiado y repetir la metodología ahí.

4 Análisis de Resultados

4.1 Determinación de la concentración de Np para la observación

Las na son visibles a través de las np dispersas en el microscopio común en la novena iteración de la preparación de la muestra: la concentración es 0.428 g por cada litro de fluido de inmersión (ver columna de la extrema derecha de la Tabla 1).

Tabla 1.- Datos de cada muestra.

Muestra n	$V_{n,1}$ (l)	$V_{n,2}$ (l)	$m_{n,1}$ (g)	C_n (g/l)
1	4.00E-04	3.80E-04	5.00E-04	1.25E+00
2	4.60E-04	4.40E-04	4.75E-04	1.03E+00
3	5.20E-04	5.00E-04	4.54E-04	8.73E-01
4	5.80E-04	5.60E-04	4.37E-04	7.53E-01
5	6.40E-04	6.20E-04	4.22E-04	6.59E-01
6	7.00E-04	6.80E-04	4.08E-04	5.83E-01
7	7.60E-04	7.40E-04	3.97E-04	5.22E-01
8	8.20E-04	8.00E-04	3.86E-04	4.71E-01
9	8.80E-04	8.60E-04	3.77E-04	4.28E-01

Lamentablemente las imágenes de las pruebas de concentración no fueron capturadas: la valoración se realizó con el ojo humano, dado que, la configuración del microscopio, la cámara CCD (por sus siglas en inglés *Charge-coupled device*) y los lentes formadores de imágenes disponibles, no eran los aptos para permitir la obtención de una imagen que no fuera poco más que algo oscuro y borroso.

Sin embargo, esta concentración no será apta cuando se use el microscopio confocal pues mostrará estar por debajo de lo que se requiere. Pero, gracias a la experiencia ganada en las pruebas de concentración en microscopio común se tuvo un entendimiento general de cómo la concentración de np afecta la visibilidad, lo que volvió al trabajo de encontrar la concentración adecuada en el microscopio confocal un proceso de prueba y error. Así, después de pocos intentos con diferentes concentraciones sobre el sustrato en el confocal, se observó que la concentración podría subir alrededor de 0.625 g de np por cada litro de fluido de inmersión y aun así ser viable para la observación y excitación.

4.2 Potencia del láser *Chameleon* sobre las Na

Todas las pruebas de potencia se hicieron sobre el mismo sustrato, en el mismo conjunto de na (Figura 26), procediendo a escoger una na y con la función *zoom* del observarla. Este

acercamiento no es de carácter digital ni óptico, esto es, lo que el confocal hace es que en lugar de escanear la zona completa de todo el campo de visión limita la captura a la zona de interés señalada. Esto no implica que se aumente la resolución de la imagen de la zona por medios ópticos, solo se está limitando la obtención de datos a esa zona, lo que permite aumentar el tiempo y número de pixeles que el láser de observación dedica a esta región, mejorando ligeramente la calidad de la imagen de esa zona. Se hace mención a que aunque la longitud de onda para excitar (1000) nm las na, dista de ser la longitud de onda de mayor resonancia [9], es la mayor longitud de onda disponible en el microscopio confocal que se usó.

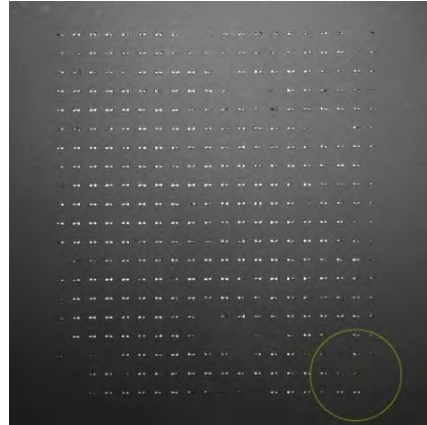


Figura 26.- Imagen del conjunto de nano antenas seleccionado: cómo se puede ver hay muchas zonas en donde las na están dañadas, tanto por irradiar con energías muy altas como por la acción de la limpieza. El círculo amarillo encierra la zona en donde se realizaron las pruebas.

Como prueba, se escogió la antena de la columna y fila veinte (C20xF20, Figura 27), que se encuentra evidentemente dañada pues solo le queda el brazo izquierdo, y se procedió a irradiarla durante un tiempo $t = 7s$, después de desplazar el sustrato un $\Delta z = 5\mu m$, con una $\lambda = 1000nm$ a 100% de potencia, 0.875 W. El daño sobre C20xF20 es evidente, incluso parece que el sustrato mismo se ve afectado por esta potencia, como se puede apreciar en la Figura 28. Por lo que es correcto asumir que es demasiada potencia durante ese tiempo.

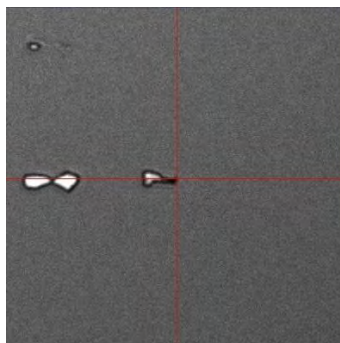


Figura 27.- La nanoantena (C20xF20) seleccionada es la del centro de la imagen, que se encuentra en la intersección de las líneas rojas, las cuales son parte del sistema *Spot-select* del *software* del microscopio confocal.

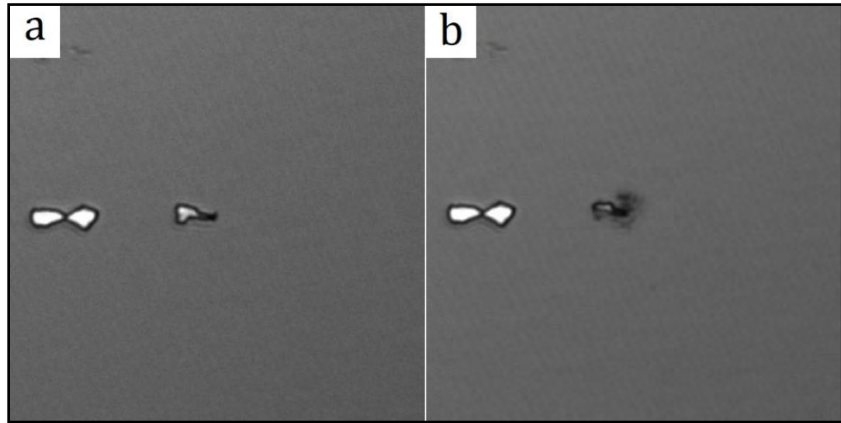


Figura 28.- a) Na antes de ser irradiada. b) Na después de ser irradiada. Se observa evidencia de daño tanto en sustrato como en la antena.

Entonces, se escogió otra na (C19xF20, Figura 29) y se volvió a irradiar con la misma potencia, λ y Δz , pero ahora se redujo el tiempo de exposición a $t = 2s$.

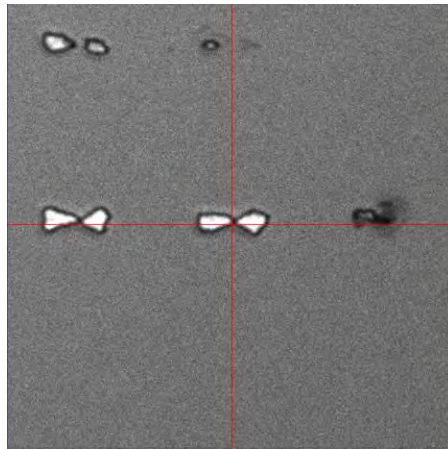


Figura 29.- La nanoantena (C19xF20) seleccionada es la de en medio de la imagen, de nuevo se utilizó el sistema *Spot-select*.

Nuevamente se aprecia daño severo en la na (Figura 30.b), pero dado que ahora C19xF20 tenía ambos brazos, se aprecia que el daño fue más grave en el lado derecho de la na que en el izquierdo, lo que sugiere que el *spot* se mueve durante la irradiación, tal vez por motivos mecánicos como perturbaciones en la mesa holográfica donde se localiza el microscopio.

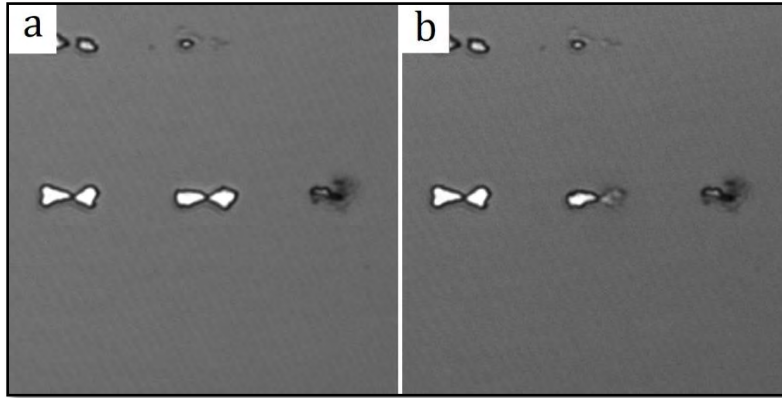


Figura 30.- a) C19x20 antes de ser irradiada. b) C19x20 después de ser irradiada. Se observa daño en la na, aunque se aprecia que es más severo del lado derecho que del izquierdo.

También es posible que el *spot* no se haya ensanchado de manera uniforme, esto quizá debido a que no se puso la zona de interés en el centro del objetivo, sino más bien, como mencionamos al principio del Capítulo, el sistema solamente escaneó una región en específico, y dicha área se encuentra en la parte inferior derecha (Figura 26), lo que hace pensar que el *spot* no se ensanchará en un círculo en las zonas alejadas del centro del campo de visión del objetivo (Figura 31). Lo anterior es muy importante, pues si en el futuro se quiere irradiar una zona de manera uniforme, esta región deberá estar en el centro del campo de visión del objetivo.

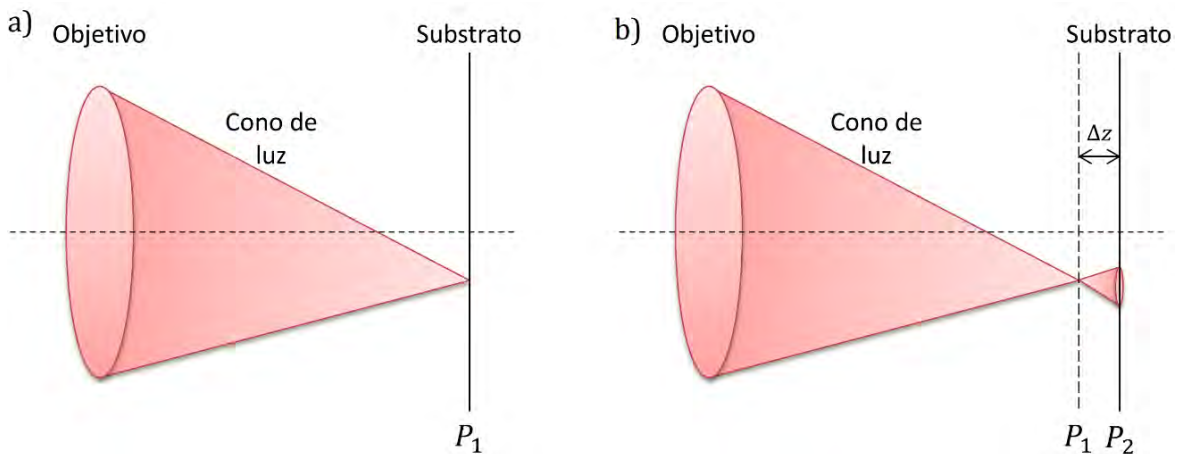


Figura 31 .- Esquema del cambio en el cono de luz cuando se desplaza la muestra para ensanchar el *spot*. a) Posición del cono de luz del láser enfocado en el sustrato, en la zona inferior del campo de visión. b) Posición del cono de luz después de desplazar el sustrato un Δz . En la imagen se observa como el haz de luz continúa su camino, pero al estar lejos del eje óptico su ensanchamiento no es uniforme, pues describe algo parecido a un óvalo.

Es de hacerse notar que el daño fue menos grave que en el caso anterior, aun así, es severo. Entonces se tomó la decisión de cesar las pruebas de potencias altas a tiempos cortos, esto dado

que en tiempos más cortos las np no tendrán tiempo a responder al campo em de las na, pues la viscosidad del fluido de inmersión será un impedimento para el desplazamiento rápido de las np.

Ahora, pasando a las pruebas con tiempos más largos a potencias más bajas, se seleccionó una na del mismo conjunto de antenas anterior (Figura 32 y Figura 33). Se optó por irradiar la misma na (C19xF18) en varias ocasiones, con el mismo $\lambda = 1000\text{nm}$ por tiempos de $t = 2\text{min}$ y con un desplazamiento $\Delta z = -2\mu\text{m}$, a potencias de 2% (17.5 mW), 3% (26.25 mW), 4% (35 mW) y 5% (43.75 mW).

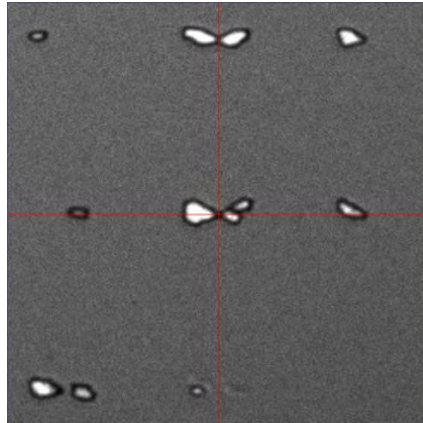


Figura 32.- La nano antena C19xF18 se encuentra en la intersección de las líneas del sistema *Spot-select* en el centro de la imagen. Como en el caso anterior, esta na se escogió por mostrar deterioro avanzado, volviéndola inviable para posteriores pruebas de excitación (solo se usó para probar su desgaste a la irradiación del láser).

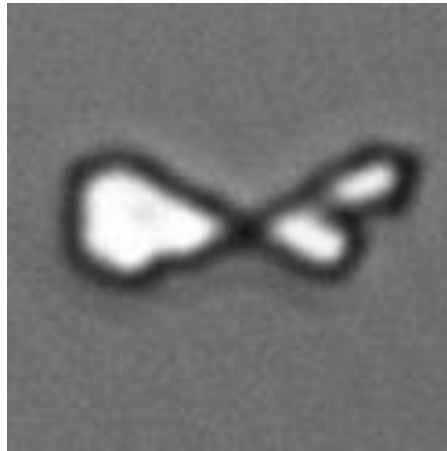


Figura 33.- Acercamiento a la na antes de ser irradiada con 1000 nm a diferentes potencias.

Continuando, se irradia a una potencia y se adquiere una imagen de la na; se irradia de nuevo con otra potencia y se captura otra imagen; se prosigue de esta manera hasta encontrar una potencia adecuada para trabajar en los experimentos de excitación de na. Lo anterior procurando que la muestra se irradie durante el mismo tiempo y Δz .

Como se observa en la Figura 34, el daño sobre la na es apenas visible, principalmente en el brazo derecho. Y lo primero que viene a la mente es la cuestión de por qué la figura que muestra más daño evidente entre el antes y el después es la Figura 34.a, siendo que es la primera que se irradió y con menos potencia (17.5 mW). La noción de que es la na que más daño sufrió surge del cambio que se dio en la zona marcada con la flecha roja, pero este daño es atribuible al desprendimiento de una porción ya pequeña y dañada de la na. Se puede ver en las imágenes subsecuentes (Figura 34.b y Figura 34.c) que aun después de irradiar con 1000 nm al 3% (26.25 mW) y 4% (35 mW), en ambas ocasiones, no hay daño apreciable en la na. Esto quizá se deba a que esa parte específica de la na ya está muy dañada y el oro (del cual están construidas las na) que se aprecia en la Figura 33 es en realidad una capa finísima que no resistió la primera acometida del láser.

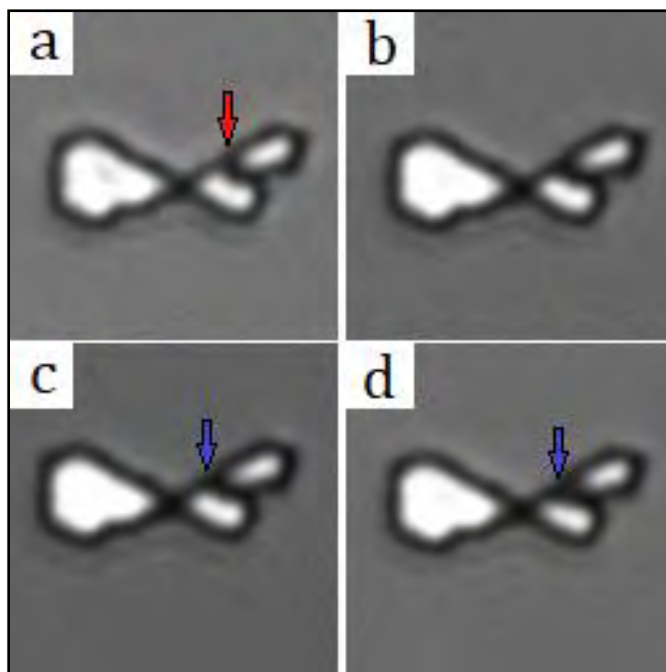


Figura 34.- Imágenes de la na después de ser irradiada con diferentes potencias. a) 2% (17.5 mW), la flecha roja apunta a la zona donde se produjo daño; b) 3% (26.25 mW); c) 4% (35 mW); d) 5% (43.75 mW). La flecha azul apunta a una región en donde se comienza a ver daño muy sutil en el brazo derecho de la antena, después de irradiar con 1000 nm a 5%.

En las Figura 34.c y Figura 34.d se observa que cuando se irradió con 5% (43.75 mW), la na comienza a mostrar signos de deterioro en la zona con la flecha azul. El desgaste es apenas perceptible, en la Figura 35 se muestra un acercamiento en la zona del desgaste (círculos amarillos). Lo que apunta a que ya el 5% del láser *Chameleon* sintonizado en 1000 nm es demasiado para la na y causará desgaste por ablación, y aunque lo hace de manera lenta, supondrá un problema en pruebas con tiempos de exposición largos.

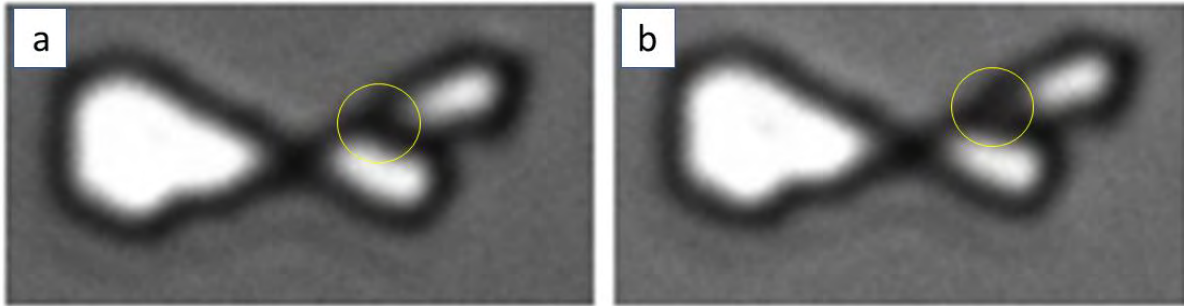


Figura 35.- Acercamiento a la na: a) Antes de ser irradiada. b) Después de ser irradiada con 1000 nm al 5% (43.75 mW).

Así, se optó por reducir la potencia del láser y repetir la prueba a 4.5 % (42 mW), $t = 2$ min y $\Delta z = -2\mu\text{m}$. Y como se puede observar en la Figura 36, no hay evidencia de daño en la na.

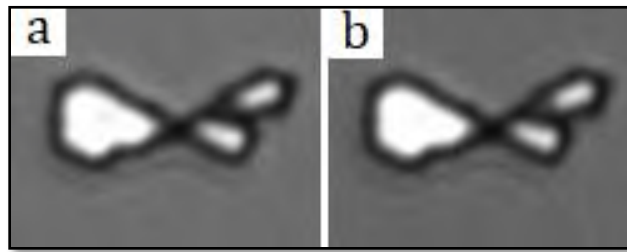


Figura 36.- Comparación na antes y después de ser irradiada. a) Antes de ser irradiada; b) Después de ser irradiada con 4.5% (39.4 mW). No hay daños aparentes en la na.

Se aumento el porcentaje de irradiación, ahora a 4.8% (42 mW), mismo tiempo y desplazamiento (Figura 37), e igual que en la prueba anterior la na no muestra señales de deterioro. Con todo lo anterior se ha obtenido una noción de la potencia que las na son capaces de resistir, lo cual nos resultará útil cuando hagamos pruebas a tiempos largos.

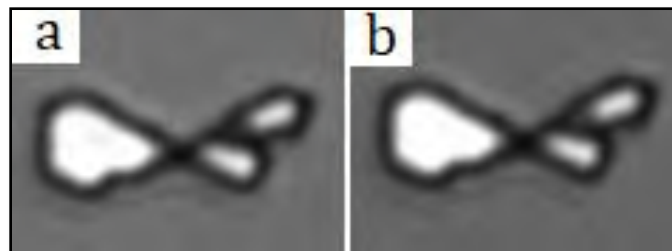


Figura 37.- Nanoantena antes (a) y después (b) de ser irradiada con 4.8% (42 mW). No hay desgaste aparente.

4.3 Potencia del láser *Chameleon* sobre las np

Las pruebas se realizaron en el modo de captura de secuencia de imágenes, esto para poder ver el comportamiento en el tiempo de las np, mientras se les irradia. Las pruebas se realizaron de dos modos principalmente; con la longitud de onda de observación $\lambda_o = 543\text{nm}$ solamente, para observar el comportamiento de las np bajo esta longitud de onda. Y después, con la longitud de onda excitación $\lambda_e = 1000\text{nm}$ y la λ_o al mismo tiempo, con el mismo propósito que la vez anterior, ie., para observar el transcurso del fenómeno en el tiempo, pero se procurará que la λ_o esté a una intensidad que no perturbe las np.

Se irradiarán grupos pequeños de cúmulos de np, tanto para simplificar la observación como para acelerar el tiempo de captura. En el sustrato, se escogió una zona adyacente a un conjunto de na, esto para que éstas actuaran de punto de referencia en el dado caso de que el cúmulo de np bajo observación se desplazase y saliera del campo de visión (Figura 38).

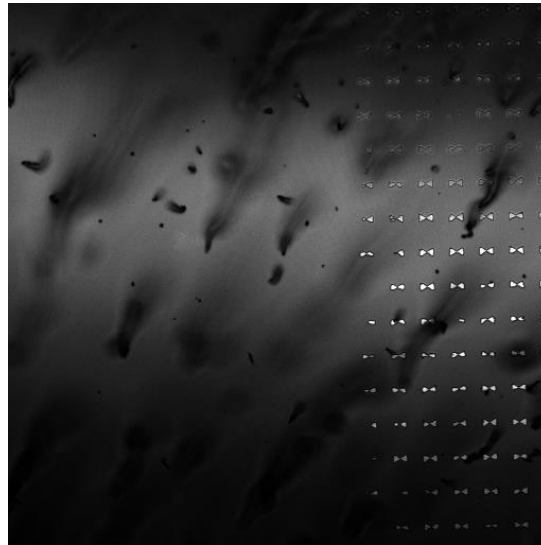


Figura 38.- Se escogió una zona continua a un conjunto de na, que sirvieron de referencia en el caso de que los cúmulos de np se desplacen en el campo de visión, pues aparte de las na y algunas marcas oportunas del fabricante, el sustrato es liso, por lo que se puede llegar a perder el cúmulo de np bajo observación, si este se mueve fuera del campo de visión.

Se procede a irradiar y observar con λ_o al 70%, en un tiempo $t = 40\text{s}$. Se escogió esta potencia en específico dado que es la máxima que se usa en la λ_o para conseguir buen contraste en las imágenes. Nótese que hay dos cúmulos (Figura 39), uno menos denso (flecha roja) que el otro (flecha azul), esto se hizo a propósito, para observar la reacción de dos cúmulos de diferentes densidades a la misma potencia.

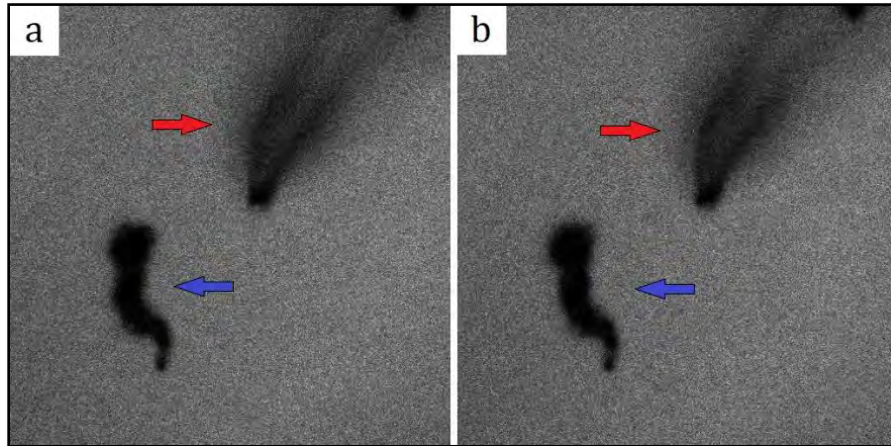


Figura 39.- Cúmulos al inicio (a) y al final (b) del proceso de irradiación. Hay dos cúmulos, el señalado por la flecha azul es más denso que el señalado por la flecha roja. Al final de la prueba se observa que el cúmulo más denso apenas se movió.

Como se puede observar en la Figura 39, el cambio fue mínimo, el cúmulo más denso parece apenas haberse movido. Entonces se observarán los mismos cúmulos mientras son irradiados con longitudes de onda λ_o y λ_e al 70% y 0.5%, respectivamente, en un tiempo $t = 40s$. Se puede ver de la Figura 40, que en esta ocasión sí hubo cambios, los cúmulos dentro de los círculos azul y rojo se vieron afectados más que el cúmulo dentro del círculo verde. Y aun así el cúmulo dentro del círculo azul se vio más alterado que el cúmulo delimitado en el círculo rojo, el cual era más pequeño, pero al mismo tiempo las np dentro del círculo verde apenas si se vieron afectadas.

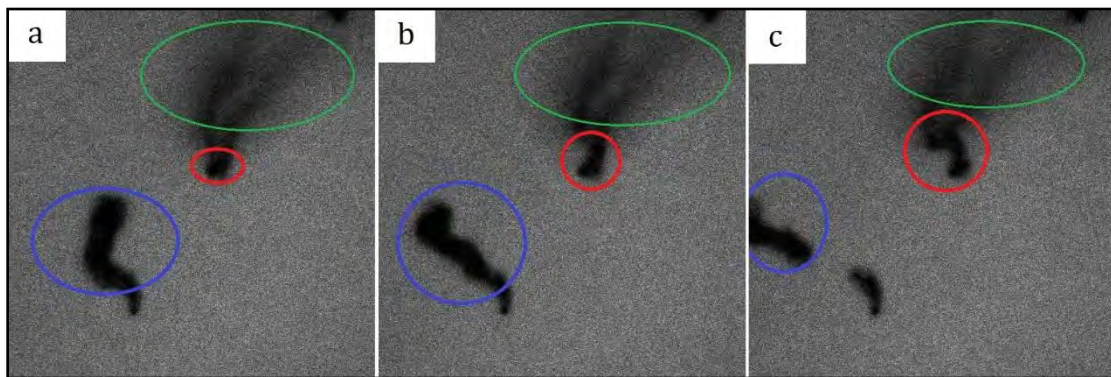


Figura 40.- a) Primera imagen tomada a un tiempo $t = 2s$; b) Imagen a un tiempo $t = 20s$; c) Imagen a un tiempo $t = 40s$. Se aprecia como con el pasar del tiempo los cúmulos más grades se ven afectados más en comparación de los chicos. El cúmulo dentro del círculo azul se vio alterado mucho más que el que se encuentra dentro del círculo rojo. Por otro lado, las np menos densas en el “velo” dentro del círculo verde apenas se vieron afectadas.

Lo anterior hace pensar que los cúmulos más densos al contener una cantidad mayor de n_p en un área más pequeña, permitieron pasar una menor cantidad de la energía del láser hasta el sustrato y la terminaron por absorber, lo que provocó que se diera un desplazamiento de n_p .

Enseguida se irradió una zona diferente, pero ahora con λ_o y λ_e al 70% y 0.2% respectivamente, durante un tiempo $t = 6 \text{ min } 30 \text{ s}$. Como se aprecia en la Figura 41, no hubo grandes cambios, ni en el cúmulo más denso (círculo azul) ni en las n_p más dispersas (círculo rojo). Lo que hace pensar que esta potencia (0.2%) es segura pues no causó ningún cambio en ninguno de los dos cúmulos.

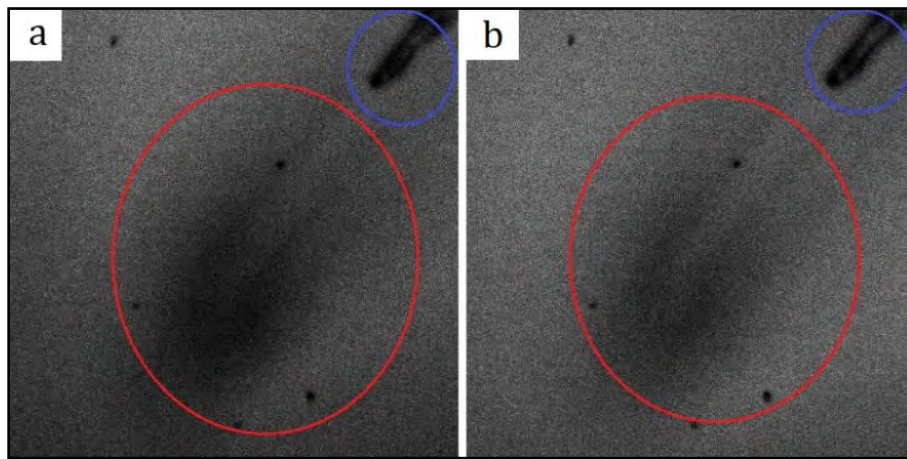


Figura 41.- a) Imagen capturada al inicio; b) Imagen capturada al final en el tiempo $t = 6 \text{ min } 30 \text{ s}$. En las imágenes se resaltan dos zonas de interés, un cúmulo denso dentro del círculo azul y un grupo de n_p menos compacto en el círculo rojo. En ninguno de los dos se observan grandes cambios.

En la Figura 42 se muestran imágenes de los dos mismos cúmulos anteriores, con los mismos λ_o y t iguales, pero ahora con λ_e al 0.5%. Y como podemos observar, el cúmulo del círculo azul (el de mayor concentración) sufrió deformaciones a lo largo del experimento, lo que nos indica que λ_e influyo sobre él. Pero en caso contrario, de nuevo, las n_p dentro del círculo rojo no sufrieron casi ninguna deformación a lo largo de todo el experimento.

En resumen, λ_o al 70% no altera las n_p , ni compactas ni dispersas. λ_e al 0.2% no afecta a las dispersas ni a las más densas. Pero, la misma longitud de onda al 0.5% si altera a los cúmulos más densos, aunque no a los más dispersos.

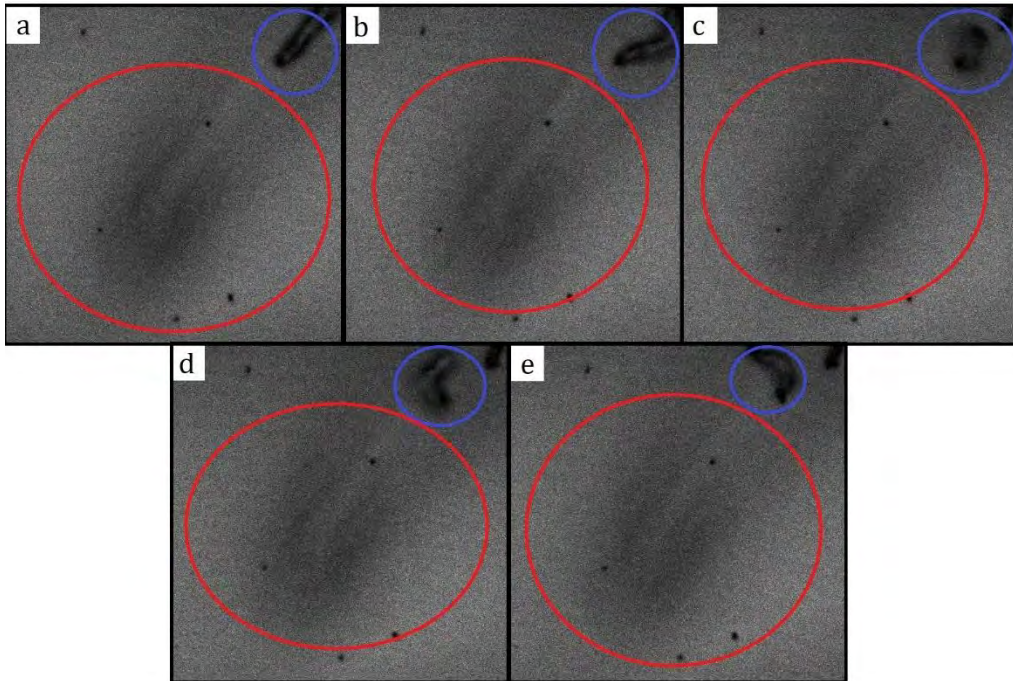


Figura 42.- a) Imagen tomada al inicio $t = 2s$; b) Cúmulos a un tiempo $t = 1 \text{ min } 39s$; c) Cúmulos a un tiempo $t = 3 \text{ min } 16s$; d) Cúmulo a un tiempo $t = 4 \text{ min } 54s$; e) Cúmulos a un tiempo $t = 6 \text{ min } 31s$.

4.4 Excitación de Na y respuesta de las Np

Usando la metodología del capítulo 3.6 Metodología para la excitación de Na y observación de la respuesta de las Np, y tomando los datos arrojados por los capítulos 4.1, 4.2 y 4.3 procedemos a hacer pruebas de respuesta de np al campo electromagnético producido por las na. El experimento se repitió una gran cantidad de veces, aquí veremos solamente los casos más representativos y en los que hubo más comportamiento de parte de las np por razón del campo de la na excitadas.

Se seleccionó el conjunto de na que se aprecia en la Figura 43. En Figura 43.a se aprecia el conjunto de antenas en un objetivo de 50x, antes de colocar el fluido de inmersión con np. En Figura 43.b se aprecia la primera imagen tomada con el objetivo de 63x después de colocar el fluido de np (concentración de 0.625 g/l). En Figura 43.c se pueden observar los cúmulos de np sobre el sustrato después de que el imán de neodimio lleva 1 minuto de colocado. Figura 43.c no se mejoró por medios digitales con la intención de dar una idea de qué tan difícil es observar sin usar el imán para reducir la densidad de np entre el objetivo y el sustrato, además de que usarlo ayuda a aumentar la presencia de np sobre las na.

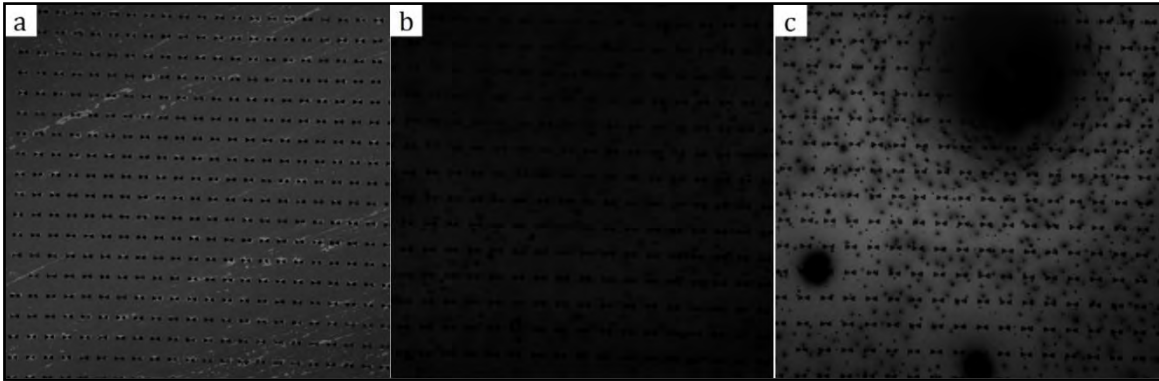


Figura 43.- a) Sustrato sin aplicar fluido de inmersión con np, observado por un objetivo 50x; b) Sustrato observado a través del 63x, con las np dispersas, antes de colocar el imán; c) Sustrato a un minuto de colocar el imán.

Después de un $t_m = 3 \text{ min}$ con el imán, se le dio un tiempo de relajación $t_r = 5 \text{ min } 30\text{s}$, y luego se irradió durante un tiempo de $t = 19 \text{ min } 47\text{s}$, con la longitud de onda de excitación λ_e a una potencia de 12% (105 mW) y un desplazamiento sobre el eje óptico de $\Delta z = 50 \mu\text{m}$. Después del periodo de irradiancia se prosiguió con la captura del patrón de np resultante. Pero resulta que hay demasiado en la imagen para apreciar algo sobresaliente, aparte de los tres cúmulos grandes de Figura 44.a que al ser demasiado densos se vieron afectados por el λ_e y se precipitaron fuera del foco de la imagen.

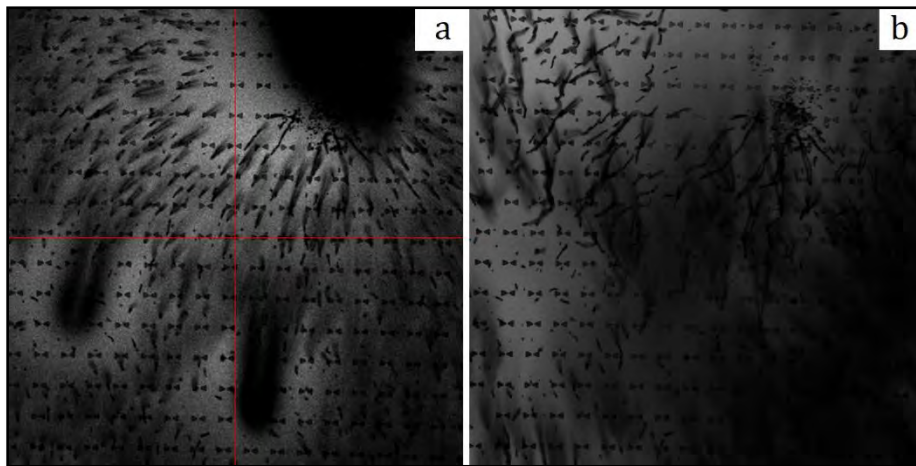


Figura 44.- a) Conjunto de na tal como se aprecia en el *software ZEN* del microscopio confocal durante el *Spot-select* después del $t_r = 5 \text{ min } 30\text{s}$ de relajación. Esas formas parecidas a cometas que se ven en la imagen son los cúmulos densos de np que se formaron por el imán, que se deformaron cuando el imán fue retirado del microscopio; b) Sustrato después de ser irradiado.

Para lograr apreciar algo es necesario hacer un acercamiento de manera digital en la zona superior izquierda (Figura 45), en la cual se ve que en las na resaltadas por los círculos azules hubo una línea de np que quedó atrapada en el centro de dos na (misma figura, inciso b), lo que concuerda con la teoría, pues el centro entre ambos brazos de las na es donde el campo es más fuerte [9]. Sin embargo, parece que estas dos na son las únicas que exhiben un evidente comportamiento de haber influenciado con su campo em a las np.

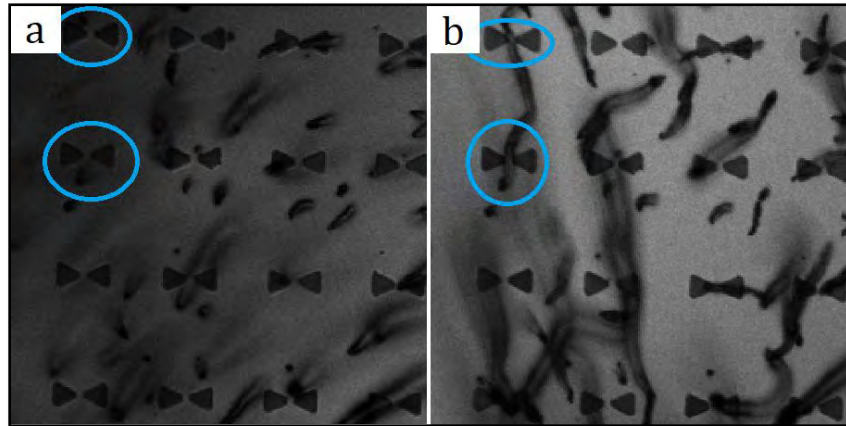


Figura 45.- Ambas imágenes son acercamientos sobre la misma zona; a) Antes de irradiar; b) Después de irradiar. Los círculos azules encierran las na de interés que lograron “atrapar” una línea de np.

En otra prueba, con una concentración de np de 0.475 g/l, tiempo de excitación $t = 3 \text{ min}$, desplazamiento sobre el eje óptico $\Delta z = 1150 \mu\text{m}$ y λ_e con una potencia 0.5% (4.38 mW), se obtuvieron las imágenes de la Figura 46, que como se puede ver en la antena central, las np ahora se reagruparon de un modo que seguía la simetría de las na. Las np parecen no haber cerrado la línea de campo de un polo al otro del campo magnético de la na y pareciera que en realidad vienen de la antena superior central. Pero hay que remarcar un hecho importante, el Δz , el cual fue demasiado grande y generó una deformación en el fluido de inmersión, como la que se observa en la Figura 25, lo que supone un movimiento de fluido de inmersión cuando el objetivo regresa a su posición de observación y este movimiento podría provocar un reacomodo de las np después de la irradiación con λ_e y antes de poder capturar el resultado.

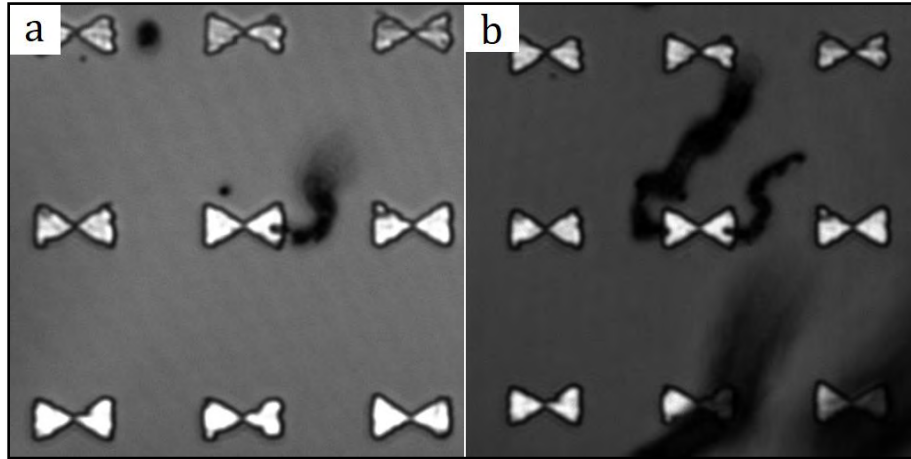


Figura 46.- a) na con np antes de ser irradiadas; b) na y np después de ser irradiadas. Se puede apreciar un reacomodo de np, el cual parece seguir la simetría de las na, pero este podría no ser el reacomodo resultante de la irradiación, pues por un número de factores como el desplazamiento del fluido de inmersión Δz , el cual fue demasiado grande, no se puede estar seguros de que es el verdadero reacomodo resultante de la excitación de las na.

Ahora, en la Figura 47 se puede ver dos imágenes de esta na a dos tiempos diferentes. Entre la Figura 47.a (acercamiento de la na central de la Figura 46.b) y la Figura 47.b, hay solo 40 segundos y sin embargo las np ya muestran signos de estar moviéndose y apartándose de la na (círculo rojo), esto se debe a que las na entraron en un periodo de relajación, disminución del campo em, tan pronto como se deja de irradiar con λ_e . Esto nos sugiere que el fenómeno es dependiente del tiempo.

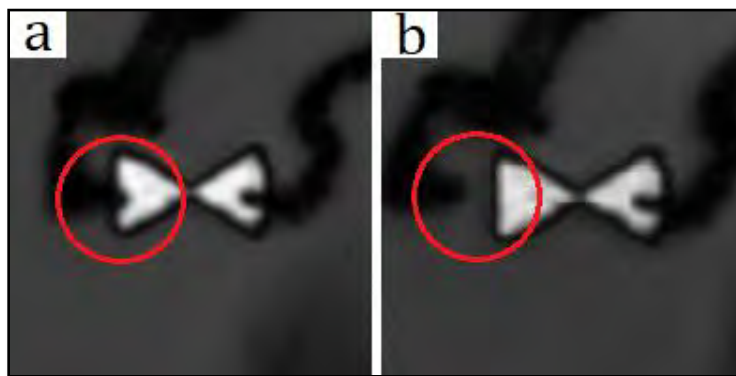


Figura 47.- a) Imagen de la na justo después de irradiar, con las np claramente superpuestas; b) 40 segundos después, las np se han desplazado y ya no están por encima de la na, dicho de otro modo, hubo un desplazamiento de las np cuando se dejó de irradiar con λ_e .

5 Conclusiones

Con base a lo observado en el análisis de resultados, se puede concluir de manera fehaciente que es posible observar el reacomodo resultante de np al ser sometidas al campo magnético derivado de excitar na tipo *bowtie* con una longitud de onda de 1000 nm, aun con impedimentos tales como no poder controlar la densidad de np en la superficie del sustrato de una manera más precisa, pues el imán involucra demasiados inconvenientes al momento de colocarlo y retirarlo, pues aún la naturaleza del movimiento al retirarlo (hacia arriba o de lado) cambiará la distribución de np sobre el sustrato y podría dejar cúmulos enormes (como los vistos en la Figura 44.c). Lo anterior dificulta de varias maneras el experimento, pues no permite la radiación de la zona, fomenta la formación de cúmulos más grandes, y como se vio en la Sección 3.5 Determinación de la potencia del láser *Chameleon* sobre las nanopartículas, estos cúmulos responderán más al láser de excitación que al campo de las na. Además, el imán por ser una alteración de naturaleza mecánica en la platina del microscopio involucra inconvenientes como el desplazamiento de foco y posible desplazamiento de campo de visión, por mencionar algunos. Las na en cuanto forman cúmulos empiezan a manifestar una tendencia a precipitarse o a formar cúmulos más grandes con las np vecinas, lo cual supone un problema pues cuando las np quedan atrapadas en las na por el campo que estas generan debido a la excitación óptica, forman cúmulos que se van haciendo más densos, y cuando la longitud de onda de excitación es retirada dichos cúmulos comienzan a desplazarse de su posición resultante del campo de las na. Esto significa que la velocidad de captura de imágenes después de irradiar es un tema a tener en cuenta, pues es mejor sacrificar un poco de calidad de las imágenes, con tal de conseguir una imagen lo más cercana posible al fenómeno real.

La concentración de np es un tema de vital importancia: si la densidad es demasiado baja el fenómeno no será observable pues las na no tendrán suficientes np en sus inmediaciones. Pero, si la densidad es demasiado alta surge un abanico de problemas tales como, que los cúmulos formados serán demasiado densos para reaccionar al campo em de las na, o bien los grupos más densos de np podrían reaccionar al haz de excitación y precipitarse hacia el objetivo, o absorber el haz de excitación y no permitir que la radiación llegue al sustrato y por lo tanto negando el efecto por completo. Para mejorar la respuesta de las np al campo em de las na sería recomendable usar una longitud de onda más cercana a la de resonancia de las na, al igual que usar un haz polarizado a 45°. Y dado que es crucial para el correcto funcionamiento del experimento, un método más eficiente y controlable para aproximar las np al sustrato y a las na.

Habiendo realizado todas las pruebas de concepto se puede concluir que la hipótesis tema de esta Tesis, a saber, que es posible observar radiación de campo electromagnético inducido por la irradiación óptica en las na, es factible, un hecho que se demostró usando np de óxido de hierro cuyo comportamiento magnético respondió sin duda alguna al campo em de las na.

6 Bibliografía

- [1] A. E. Krasnok *et al.*, “Optical nanoantennas,” *Physics-Uspexhi*, vol. 56, no. 6, pp. 539–564, 2013.
- [2] T. H. Taminiau, F. D. Stefani, F. B. Segerink, and N. F. Van Hulst, “Optical antennas direct single-molecule emission,” *Nat. Photonics*, vol. 2, no. 4, pp. 234–237, 2008.
- [3] S. Kim, J. Jin, Y. J. Kim, I. Y. Park, Y. Kim, and S. W. Kim, “High-harmonic generation by resonant plasmon field enhancement,” *Nature*, vol. 453, no. 7196, pp. 757–760, 2008.
- [4] R. M. Bakker *et al.*, “Nanoantenna array-induced fluorescence enhancement and reduced lifetimes,” *New J. Phys.*, vol. 10, 2008.
- [5] P. Anger, P. Bharadwaj, and L. Novotny, “Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 96, no. 11, pp. 3–6, 2006.
- [6] K. Kneipp *et al.*, “Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS),” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 78, no. 9, pp. 1667–1670, Mar. 1997.
- [7] G. Das *et al.*, “Nano-patterned SERS substrate: Application for protein analysis vs. temperature,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 6, pp. 1693–1699, 2009.
- [8] F. Neubrech, A. Pucci, T. W. Cornelius, S. Karim, A. García-Etxarri, and J. Aizpurua, “Resonant plasmonic and vibrational coupling in a tailored nanoantenna for infrared detection,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 101, no. 15, pp. 2–5, 2008.
- [9] C. Moreno, J. Méndez-Lozoya, G. González, F. J. González, and G. Boreman, “Near-field analysis of discrete bowtie plasmonic nanoantennas,” *Microw. Opt. Technol. Lett.*, no. March, p. mop.32108, Oct. 2019.
- [10] L. H. Reddy, J. L. Arias, J. Nicolas, and P. Couvreur, “Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications,” *Chem. Rev.*, vol. 112, no. 11, pp. 5818–5878, Nov. 2012.
- [11] E. R. Encina and E. A. Coronado, “Plasmonic nanoantennas: Angular scattering properties of multipole resonances in noble metal nanorods,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 112, no. 26, pp. 9586–9594, 2008.
- [12] L. Novotny, “Effective wavelength scaling for optical antennas,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 98, no. 26, pp. 1–4, 2007.
- [13] J. Wessel, “Surface-enhanced optical microscopy,” *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 2, no. 9, p. 1538, 1985.
- [14] A. S. M. Z. Kausar, A. W. Reza, T. A. Latef, M. H. Ullah, and M. E. Karim, “Optical nano antennas: State of the art, scope and challenges as a biosensor along with human exposure to nano-toxicology,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 15, no. 4, pp. 8787–8831, 2015.
- [15] T. Pakizeh and M. Käll, “Unidirectional ultracompact optical nanoantennas,” *Nano Lett.*, vol. 9, no. 6, pp. 2343–2349, 2009.
- [16] Y. Yang, H. T. Dai, and X. W. Sun, “Fractal diabolito antenna for enhancing and confining the

- optical magnetic field," *AIP Adv.*, vol. 4, no. 1, pp. 0–5, 2014.
- [17] T. Coenen, E. J. R. Vesseur, and A. Polman, "Deep subwavelength spatial characterization of angular emission from single-crystal Au plasmonic ridge nanoantennas," *ACS Nano*, vol. 6, no. 2, pp. 1742–1750, 2012.
- [18] P. Bharadwaj, B. Deutsch, and L. Novotny, "Optical Antennas," *Adv. Opt. Photonics*, vol. 1, no. 3, p. 438, Nov. 2009.
- [19] E. Calandrini, A. Cerea, F. De Angelis, R. P. Zaccaria, and A. Toma, "Magnetic hot-spot generation at optical frequencies: From plasmonic metamolecules to all-dielectric nanoclusters," *Nanophotonics*, vol. 8, no. 1, pp. 45–62, 2018.
- [20] B. R. Masters, *Confocal Microscopy and Multiphoton Excitation Microscopy: The Genesis of Live Cell Imaging*, no. 1. SPIE, 2006.
- [21] J. B. Pawley, *Handbook of biological confocal microscopy: Third edition*, 3rd ed. Springer, 2006.
- [22] W. Denk, J. Strickler, and W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy," *Science (80-.)*, vol. 248, no. 4951, pp. 73–76, Apr. 1990.
- [23] V. Pourreza Ghousechi, "Opto-Mechanical Design And Development of an Optodigital Confocal Microscope," Koc University, 2017.
- [24] Y. Tang *et al.*, "Synthesis of sub-100 nm biocompatible superparamagnetic Fe₃O₄ colloidal nanocrystal," *RSC Adv.*, vol. 6, pp. 62550–62555, 2016.
- [25] Z. Mo, C. Zhang, R. Guo, S. Meng, and J. Zhang, "Synthesis of Fe₃O₄ Nanoparticles Using Controlled Ammonia Vapor Diffusion under Ultrasonic Irradiation," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 50, no. 6, pp. 3534–3539, 2011.

Publicaciones de la presente tesis

Como parte de la presente tesis se asistió a dos congresos de los cuales se produjeron las siguientes *Proceedings*:

- [1] D. Luis, F. Mendoza, J. M. Flores, J. Méndez-Lozoya, F. J. González: "Nano-antennas Excitation with Visible Light and Their Observed Response with a Confocal Microscope in the THz Range", en Proc. de International Symposium on Optomechatronic (2018), Springer, 2018. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9632-9_6
- [2] Daniel Luis, Fernando Mendoza-Santoyo, Jorge Mauricio Flores Moreno, Francisco Javier González Contreras, Javier Méndez-Lozoya, "Nano-antennas excitation with visible light and their response as observed with a confocal microscope", Proceedings of SPIE Vol. 11102, 111021N (2019) SPIE Digital Library. <https://doi.org/10.1117/12.2529726>